



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS BIOQUÍMICA E  
INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**MARCADORES DE LA EXPOSICIÓN A TÓXICOS EN LÍQUIDO  
FOLICULAR DE PACIENTES ESTÉRILES, SOMETIDAS A FIV  
Y SU RELACIÓN CON LA TASA DE GESTACIÓN**

ISAAC COHEN CORCÍA

MÁLAGA 2015



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Isaac Cohen Corcía

 <http://orcid.org/0000-0001-6997-4012>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

*A mi esposa e hijos*

---

## **AGRADECIMIENTOS**

El esfuerzo, entrega y sacrificio a la hora de elaborar una Tesis Doctoral sólo es percibido por el doctorando y las personas que le rodean, a las cuales quiero agradecer, una por una, su gran ayuda, apoyo y colaboración para hacer realidad una ilusión.

En primer lugar, a mis directores los Doctores Ernesto González Mesa y Luis Cóndor Muñoz, por su incondicional apoyo para hacer posible este proyecto. Gracias al Dr. González Mesa desarrollamos nuestra original hipótesis de trabajo sin parangón en la literatura.

Más aún, al Dr. Pedro García Fortea, sin cuya inestimable ayuda y colaboración, no hubiese sido posible realizar esta Tesis Doctoral. Deseo expresarle mi más profundo agradecimiento por transmitirme sus grandes conocimientos del método científico y el manejo estadístico necesario para poder procesar todos los datos recavados.

A D. Pablo Rivero Gil, por su magnífica colaboración a la hora de estructurar los textos, tablas, gráficos e imágenes.

A la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Materno Infantil de Málaga por su apoyo y colaboración para recoger los casos. A todos y cada uno de sus miembros: Dr. Alberto Reche Rosado (Jefe de Sección), Dra. Ana Gutiérrez Rueda, Dra. Ana Ruíz Martín, Dr. Francisco Campos Pérez, Dra. Rocío López-Jurado de la Cruz, Dr. Juan Ruíz Escalera, D<sup>a</sup> Carmen Muriel Sedano, D<sup>a</sup> María José Sánchez Martín, D<sup>a</sup> Isabel Hinojo Prieto y, en especial, a D<sup>a</sup> Amalia Teresa Tamayo Moya, por animar a participar a las pacientes en este estudio.

A la Dra. Tatiana Díaz Córdoba, por su rigurosa colaboración para procesar y preservar las muestras en el Biobanco.

A la Dra. Isabel Hierro Martín, por haberme facilitado el cambio de Departamento para poder realizar la Tesis Doctoral en un campo más afín a mis deseos.

A la Dra. Celia Cuenca Marín, por haberme servido de guía con sus conocimientos.

Se me hace imposible terminar esta lista de agradecimientos sin reservar un lugar muy especial a mi esposa Elizabeth y a mis hijos Ruth, Alberto y Mario por haber

comprendido y soportado a lo largo de estos años la falta de dedicación que se merecen y que intentaré compensarles de algún modo. Gracias querida familia.

Por fin, recordar con profunda emoción la memoria de mi padre Elías, de mi madre Emilia y de mi hermano Alberto a los que debo todo lo que he llegado a ser.

## **RESUMEN**

### **Título**

**Marcadores de la exposición a tóxicos en líquido folicular de pacientes estériles, sometidas a FIV y su relación con la tasa de gestación.**

### **Objetivos:**

- (1) Determinación de tóxicos en líquido folicular ovárico obtenido mediante punción y de pelo en el contexto de técnicas de reproducción asistida.
- (2) Tipo de distribución de la concentración de As, Cd, Hg y As en líquido folicular y pelo.
- (3) Comparar los resultados en líquido folicular (matriz de referencia de exposición). con los obtenidos en pelo
- (4) Comparar los resultados con los obtenidos por cuestionario.
- (5) Disponer de una cohorte de pacientes estériles expuestas y no expuestas a tóxicos, que podrá ser seguida posteriormente para evaluar los efectos a medio-largo plazo resultantes en cuanto a tasas de ciclo de FIV, riesgo de aborto, patología obstétrica y resultados perinatales.

### **Diseño:**

Estudio observacional transversal con muestreo consecutivo en el que se incluyen pacientes sometidas a punción ovárica folicular en el contexto de técnicas de reproducción asistida.

### **Ámbito:**

Hospital Regional y Universitario (HRU) de Málaga.

### **Periodo:**

Del 3 de febrero de 2014 al 10 de marzo de 2015.

**Sujetos:**

Pacientes sometidas a punción ovárica folicular en el contexto de técnicas de reproducción asistida durante aproximadamente 13 meses (234 casos).

**Instrumentación:**

- (A) Historia clínica de la paciente y su pareja.
- (B) Cuestionario de datos demográficos, socioeconómicos, nivel de instrucción, actividad física, consumo y exposición a tabaco, alcohol, cafeína, otros tóxicos ambientales y alimentación de la paciente. Datos socioeconómicos y consumo de tabaco de la pareja (ver apéndice).
- (C) Fármacos utilizados para la FIV: gonadotropinas recombinantes (FSH y LH), análogos y antagonistas de la GnRH, progesterona natural micronizada y otros adyuvantes.
- (D) Muestras biológicas: líquido folicular y cabello de la paciente.
- (E) Quirófano y laboratorio de RA.
- (F) Libro de registro de laboratorio de RA.
- (G) Registro de partos del HRU de Málaga.
- (H) Laboratorio de espectrometría.
- (I) Paquete estadístico (SPSS v.23).

**Determinaciones:**

- (A) Biomarcadores de tóxicos (metales pesados) detectados en líquido folicular y en pelo de la paciente mediante espectrometría de masas de alta y baja resolución
- (B) Eje gonadal basal y tiroideo de la paciente durante el último año.

## **Análisis estadístico:**

Estudio descriptivo y analítico de las variables dependientes e independientes.

## **Resultados:**

- (A) Determinar diferencias estadísticamente significativas entre pacientes expuestas y no expuestas a tóxicos.
- (B) Determinar si existe asociación entre los niveles de metales pesados y las tasas de gestación clínica (saco/s comprobados por ecografía).

## **Conclusiones:**

- 1) Existe la posibilidad de determinar sustancias tóxicas, como son los metales pesados, y correlacionarlas entre el líquido folicular y el pelo en las pacientes sometidas a FIV.
- 2) Las asociaciones más relevantes encontradas son:
  - a) Correlación positiva de las concentraciones de As entre líquido folicular y pelo.
  - b) Correlación inversa entre la concentración de Pb en pelo y la tasa de gestación.
- 3) El As en pelo podría ser un buen candidato para ser estudiado como biomarcador en fertilidad, ya que es el único que presentaba correlación positiva consigo mismo entre pelo y líquido folicular, además de correlacionarse con los otros 3 metales pesados en las 2 matrices biológicas. Investigaciones futuras deberían mostrarnos el significado de estas asociaciones.
- 4) Los hallazgos encontrados podrían servir de referencia para investigar biomarcadores en una matriz biológica de referencia alternativa de fácil acceso, como el pelo, que podría aportarnos información diagnóstica, terapéutica y pronóstica en Medicina de la Reproducción.
- 5) Son necesarios más estudios para confirmar estos hallazgos y someter la muestra estudiada a un análisis multivariante para despejar los factores de confusión y verificar las asociaciones.



- 6) Los resultados de los análisis por espectrometría de los metales pesados y otras sustancias deben ser interpretados con cautela, ya que no existen métodos universales para determinarlos, además una elevada dispersión de los resultados y un elevado número de factores de confusión pueden llevarnos a error. Sería conveniente estandarizar las técnicas de detección, así como su metodología para poder establecer unos “*cut off*” adecuados de toxicidad.
- 7) Los estudios en toxicología de la reproducción son tremendamente complejos y precisan de participación multidisciplinar.
- 8) Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre toxicología y fertilidad se basan en modelos animales experimentales y en estudios epidemiológicos con series poblacionales muy limitadas, con lo que las conclusiones son difícilmente extrapolables a los humanos, entre otras causas porque la exposición en la vida real a potenciales tóxicos, tanto naturales como de síntesis, suele ser a concentraciones de difícil detección y prolongadas el tiempo

## **INDICE**

### **I. INTRODUCCIÓN**

1. DISFUNCIÓN REPRODUCTIVA: PERSPECTIVA GLOBAL	6
1.1. Conceptos básicos	6
1.2. Esterilidad. Factores: Epidemiología. Fisiopatología. Clínica. Diagnóstico. Tratamiento	6
1.2.1. Factor femenino	8
1.2.2. Factor masculino	45
1.2.3. Factor mixto	46
1.2.4. Esterilidad de origen desconocido	46
1.3. Infertilidad: Factores. Epidemiología. Fisiopatología. Clínica. Diagnóstico. Tratamiento	55
1.3.1. Concepto y epidemiología de infertilidad	56
1.3.2. Inicio del estudio y estrategia diagnóstica	57
1.3.3. Causas de infertilidad	58
1.4. Estudio de la pareja estéril	63
1.4.1. Análisis de la calidad seminal	65
1.4.2. Pruebas de normalidad de útero y trompas de Falopio	66
1.4.3. Pruebas de calidad de la ovulación	67
1.5. Técnicas de reproducción asistida actuales	71

1.5.1. Inseminación artificial	71
1.5.2. FIV/ICSI	73
1.5.3. Donación de ovocitos	73
1.5.4. Vitrificación de ovocitos	74
1.5.5. Diagnóstico genético preimplantacional	75
1.6. Factores pronósticos en FIV/ICSI	75
1.7. Protocolos de estimulación ovárica en FIV/ICSI	81
1.8. Metodología de laboratorio de FIV/ICSI	88
1.9. Nuevas tecnologías aplicadas a la selección embrionaria	106
1.10. Matrices biológicas de exposición a tóxicos: EL PELO	112
1.11. Influencia de los tóxicos medioambientales sobre la salud y la fertilidad	124
1.11.1. Contaminación química global	125
1.11.2. Los contaminantes químicos como disruptores endocrinos	131
1.11.3. Contaminantes tóxicos persistentes	139
1.11.3.1. Contaminantes orgánicos persistentes	142
1.11.3.2. Contaminantes inorgánicos persistentes	157
1.11.3.2.1. Arsénico	158
1.11.3.2.2. Cadmio	164
1.11.3.2.3. Mercurio	170
1.11.3.2.4. Plomo	176
1.11.4. Estudios de los contaminantes ambientales sobre la fertilidad	181
1.11.5. Estilos de vida y su influencia sobre los tratamientos de reproducción asistida	182

1.11.5.1. Estrés	182
1.11.5.2. Índice de masa corporal	184
1.11.5.3. Dieta y actividad física	187
1.11.5.4. Hábito tabáquico	188
1.11.5.5. Alcohol	204
1.11.5.6. Cafeína	205
1.11.5.7. Drogas de abuso	206
1.11.5.8. Estrés oxidativo	208
1.11.6. Consideraciones finales sobre toxicidad y fertilidad	211

## **II. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

2.1. Hipótesis	214
2.2. Preguntas de investigación	214
2.3. Justificación del estudio	214
2.4. Objetivos	214
2.4.1. Objetivos generales principales	214
2.4.2. Objetivos generales secundarios	215
2.4.3. Objetivos específicos	215

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

3.1. Muestra de pacientes y marco de estudio	220
3.1.1. Diseño del estudio	220
3.1.2. Ámbito	220
3.1.3. Sujetos participantes	220
3.1.4. Criterios de inclusión y exclusión	221
3.1.5. Periodo de estudio	221
3.1.6. Estimación del tamaño muestral	222

3.1.7. Descripción de la muestra y elaboración de variables	223
3.2. Instrumentos	246
3.2.1. Historia clínica, cuestionarios y consentimiento	246
3.2.2. Fármacos utilizados	247
3.2.3. Dotación de equipamiento, materiales y reactivos.	249
3.3. Procedimientos	252
3.3.1. Recogida de datos	252
3.3.2. Descripción de los protocolos seguidos: estimulación, punción, transferencia, manejo de las muestras, análisis de laboratorio	253
3.3.3. Protocolo de recogida y almacenamiento de las muestras en el Biobanco	267
3.3.4. Determinaciones de analitos	267
3.3.5. Procedimiento analítico de líquido folicular y pelo	268
3.4. Análisis estadístico	273
3.4.1. Estudio descriptivo	273
3.4.2. Estudio analítico o inferencial	273
3.5. Aspectos éticos	274
<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Estudio descriptivo	277
4.2. Estudio analítico o inferencial	306
<b>V. DISCUSIÓN</b>	344
<b>VI. LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b>	360

<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	362
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	365
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	376

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

**aCGH:** Arrays de hibridación genómica comparada

**aLH:** Acción de hormona luteinizante

**AMH:** Hormona antimülleriana

**As:** Arsénico

**ASEBIR:** Asociación española para el estudio de la Biología de la Reproducción

**ASRM:** Sociedad americana de medicina de la reproducción

**C.D.C:** Centro de control y prevención de enfermedades de E.E.U.U.

**Cd:** Cadmio

**DGP:** Diagnóstico genético preimplantacional

**DHA:** Ácido docosahexaenoico

**EOD:** Esterilidad de origen desconocido

**ESHRE:** Sociedad europea de reproducción humana y embriología

**FISH:** Hibridación in situ mediante fluorescencia

**FIV:** Fecundación in vitro

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**FSH-r:** Hormona foliculoestimulante recombinante

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**hCG:** Gonadotropina coriónica humana

**hCG-r:** Gonadotropina coriónica humana recombinante

**HEOC:** Hiperestimulación ovárica controlada

**Hg:** Mercurio

**HMG:** Gonadotropina humana de menopáusica

**IA:** Inseminación artificial

**IAC:** Inseminación artificial conyugal

**IAD:** Inseminación artificial con donante

**ICSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoide

**IU:** Inseminación intrauterina

**IMC:** Índice de masa corporal

**IMSI:** Inyección de espermatozoide seleccionado morfológicamente

**LH:** Hormona luteinizante

**LH-r:** Hormona luteinizante recombinante

**LOD:** Límite de detección

**MACS:** Magnetic activated cell sorting

**MBE:** Medicina basada en la evidencia

**P:** Percentil

**Pb:** Plomo

**PICSI:** Preselección de espermatozoides para ICSI

**RFA:** Recuento de folículos antrales

**RN:** Recién nacido

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**SCSA:** Sperm chromatin structure assay

**SEF:** Sociedad española de fertilidad

**SGP:** Screening genético preimplantacional

**SHO:** Síndrome de hiperestimulación ovárica

**SOP:** Síndrome de ovario poliquístico

**TE:** Transferencia embrionaria

**TRA:** Técnica o tratamiento de reproducción asistida

**ZP:** Zona pelúcida





Las alteraciones de la fertilidad se han constituido como uno de los principales problemas de salud reproductiva, en especial en los países desarrollados, donde el retraso voluntario de la maternidad ha determinado un incremento progresivo de la *edad* para llevarla a cabo, al tiempo que asistimos a un aumento de la incidencia de disfunciones reproductivas asociadas al envejecimiento de las células germinales, fundamentalmente femeninas.

Las respuestas que la investigación biomédica y la medicina clínica han dado a estos problemas experimentó una verdadera revolución con el advenimiento de la *fecundación in vitro* a finales de los años 70 del siglo XX. El desarrollo de este conjunto de técnicas, y la rápida incorporación de procedimientos complementarios, permitieron un vertiginoso incremento de la eficacia y seguridad de los tratamientos, que desde hace años se aplican de forma habitual y eficiente.

La rápida progresión de estas terapias ha sido posible gracias a la aplicación en *Medicina de la Reproducción Humana* de avances en biología celular, molecular, endocrinología y farmacología, fruto a su vez del incremento acumulativo del conocimiento en *Biología de la Reproducción*, y del asombroso desarrollo tecnológico acaecido en las últimas décadas.

La realidad actual es que la reproducción humana asistida representa un conjunto de recursos terapéuticos ampliamente estandarizados y muy difundidos en los países desarrollados. El desarrollo y aplicación de estas técnicas ha potenciado el crecimiento exponencial de una disciplina, la *Medicina de la Reproducción Humana*, que representa hoy un ámbito complejo, dinámico, e interrelacionado con multitud de áreas de conocimiento pertenecientes, entre otras, a las ciencias biomédicas básicas y aplicadas, las ciencias del comportamiento, la Bioética y el Derecho biosanitario.

### **Hitos históricos de la Medicina de la Reproducción**

- **Desde el siglo XVII hasta 1978**

Desde hace siglos, era de interés el conocer la posibilidad de realizar tratamientos médicos con el objetivo de obtener descendencia, pero, mientras otras disciplinas de la Medicina lograban evolucionar, la carencia de determinadas herramientas elementales impedía el conocimiento en este sentido.

A pesar de la evidencia de la necesidad del varón, y el origen a partir de huevos de ciertos animales, hasta el desarrollo del microscopio no se determinó la existencia de los espermatozoides ni los óvulos como gametos responsables del proceso reproductivo.

En 1555 el anatomista belga Andrés Vesalio describió por primera vez los folículos como portadores de los óvulos. Harvey publicó la descripción del ovocito en 1651, aunque erróneamente creyó que era el resultado de la concepción. Poco después, Stensen describió los ovarios como los testículos femeninos, y observó que eran análogos a los ovarios de los animales ovíparos.

El descubrimiento del espermatozoide fue descrito inicialmente por Van Leewenhoek en 1677, en una carta a la Royal Society, y los definió como "animáculos o gusanos espermáticos". Se le requirió volver a estudiar las muestras de semen de otras especies, y surgió la polémica con Huygens y Hartsoeker que habían realizado observaciones similares con anterioridad, e incluso antes Johan Ham cuyo error fue no publicarlas antes.

En 1827 fue descubierto el ovocito, si bien a primera fecundación animal fue observada por von Baer y van Beneden, en 1875. Es decir, que hasta prácticamente bien pasado 1850, se seguía sin saber su función, y se pensó que los espermatozoides eran parásitos. Von Baer fue el primero en bautizarlos con su nombre actual.

A mediados del siglo XVIII, Spallanzani confirmó la presencia de espermatozoides en diversas especies animales (peces, mamíferos y anfibios), observando en las ranas que únicamente se fecundaban los ovocitos en contacto con el semen, asistiendo quizá a la primera FIV de la historia. Esta capacidad del semen se destruía por calor, desecación, y exposición a distintos compuestos químicos. Al filtrar el semen, además, también se suspendía esa capacidad. En experimentos posteriores, hallaron que era imprescindible tener espermatozoides móviles para la fecundación adecuada en ranas, e incluso hipotetizaron que cada uno de ellos fecundaba a un solo ovocito. Esto lo realizaron en experimentos donde el número de ovocitos era mayor que el de espermatozoides.

En contra de los pensamientos de la época, hacia mediados del siglo XIX, Von Kolliker fue el primero en demostrar histológicamente que los espermatozoides no eran parásitos y que se generaban por el proceso de la espermatogénesis. El debate en esa época se centraba en si el embrión estaba preformado en el tejido reproductivo del padre o de la

madre. Esto dividió la opinión entre los ovistas y los espermatozistas, opinando estos últimos que el espermatozoide era el ser completo que debía ser incubado por la madre.

La primera demostración de la fecundación tuvo lugar en *Áscaris*, donde se observó la entrada de un espermatozoide en un óvulo transparente. Lo hizo Henry Nelson en 1852.

Van Beneden describió la primera reducción en el número de cromosomas en los gametos de *Áscaris*, determinando su importancia en la herencia, sugiriendo que eran el vehículo mediante el cual se pasa la información entre generaciones 1879 y 1883.

Von Baer fue considerado como el primer embriólogo. Además del ovocito en mamíferos, catalogó los estadios tempranos de desarrollo embrionario en 1826.

Las primeras técnicas de reproducción asistida, como tal, fueron iniciadas antes del S.XIX, aunque puede que fueran anteriores y no se hubieran descrito. Evidentemente mediante inseminación artificial, John Hunter se cree que fue el primer médico en practicarla, sobre 1790, para tratar a un paciente con hipospadias, utilizando una jeringa, y fue descrito años después de su muerte, para evitar los problemas éticos que este tipo de técnica podía generar en su momento.

La primera *inseminación* conocida publicada por el propio autor tuvo lugar en Francia, en 1838, por el Dr. Girault, dedicándose el primer capítulo de libro a ello, en 1866, por parte del Dr. Sims, en Estados Unidos. La primera inseminación artificial con uso de semen de donante fue descrita por Mantegazza, en Italia, en 1887.

En lo que a la *crioconservación* se refiere, Spallanzani, ya en 1776 congeló con éxito espermatozoides, y la creación de Bancos de Semen, e incluso de la inseminación postmórtem, ya fue comentada por Mantegazza en 1866. Aun así, hasta el uso inicial del *glicerol* en 1949, no fue algo ampliamente extendido en los laboratorios. Las primeras publicaciones con recién nacidos vivos y sanos con estas técnicas datan de 1953. Bunge y Sherman fueron los primeros autores que lo reportaron. En embriones, la primera constancia bibliográfica se tiene desde 1984, por parte de Zeilmaker.

Ya en 1878 y 1912 se publicaron los intentos de uso de gametos animales para lograr la fecundación y el desarrollo embrionario. Aun así, hasta no definir en 1951 el proceso de capacitación (Austin y Chang), y reacción acrosómica previa a la entrada a la

zona pelúcida, no se sentaron las bases. Yanagimachi y Chang fueron los primeros en usar espermatozoides capacitados in vitro en 1963.

El primer éxito de la fecundación in vitro en humanos fue llevado a cabo por *Edwards y Steptoe* en 1969, al observar la formación de pronúcleos en los ovocitos.

En 1970 consiguieron desarrollar embriones hasta 16 células, y en 1978 reportaron el primer nacimiento en el mundo de un bebé probeta.

- **La era post FIV**

El impacto de las técnicas de fecundación in vitro puede verse en el número de tratamientos en el mundo que se realizan en la actualidad: más de tres millones de bebés nacieron a través de tratamientos de fertilidad desde que llegó al mundo el primer niño concebido por fertilización in vitro (FIV) hace tres décadas. Desde entonces, el número de hijos concebidos cada año a través de técnicas de reproducción asistida (TRA) trepó desde 30.000 en 1989, primer año en que se recopilaban datos, a 200.000 en el año 2002.

En 1992 se lograron los primeros ciclos de FIV mediante la micromanipulación de gametos, microinyectando espermatozoides dentro de óvulos.

El primer *diagnóstico genético preimplantacional* (DGP) fue llevado a cabo en 1990 para determinar el sexo, por PCR de regiones del cromosoma Y, y el genético, en 1992, por el mismo grupo, para descartar embriones portadores de fibrosis quística.

El primer lavado de semen para varones seropositivos. Fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Semprini en Italia, en 1992, tras la comprobación de la ausencia de antígenos del virus en semen mediante la detección por inmunofluorescencia del p24.

Las biopsias de testículo para tratar los casos severos de infertilidad masculina se realizaron poco después, hacia 1993, por parte del Dr. Silber.

A pesar de conseguir congelar ovocitos con éxito mediante el proceso de vitrificación y lograr un embarazo posterior hacia 1990, solamente en 2005 se logró desarrollar la técnica gracias a la cual este proceso tiene un rendimiento que le permite ser implementado de rutina en las clínicas de reproducción.

## 1. DISFUNCIÓN REPRODUCTIVA: PERSPECTIVA GLOBAL

### 1.1. Conceptos básicos:

- **Esterilidad:** incapacidad de una pareja para conseguir una gestación. Supone alrededor del 18% de las parejas en edad fértil (SEF, SEGO, ASRM, ESHRE).
- **Esterilidad primaria:** nunca logra embarazo. Debemos tener en cuenta la edad de la mujer para iniciar su estudio y tratamiento.
  - ✓ Mujer < 35 años de edad tras 1 año sin conseguir gestación.
  - ✓ Mujer ≥ 35 años de edad tras 6 meses sin conseguir gestación.
- **Esterilidad secundaria:** no logra embarazo en el plazo de 1 año tras haber tenido algún hijo vivo.
- **Infertilidad:** incapacidad para conseguir un hijo vivo aunque logre embarazo. Puede ser también primaria si no existe el antecedente de un hijo vivo y secundaria si la mujer ha tenido un hijo vivo y no logra tener otro en los sucesivos embarazos.
- **Subfertilidad:** se precisa más de 1 año para lograr un embarazo.
- **Disfunción reproductiva:** engloba esterilidad, infertilidad y subfertilidad.

### 1.2. ESTERILIDAD: FACTORES, EPIDEMIOLOGÍA, FISIOPATOLOGÍA, CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

En España se estima que un 15-18% de las parejas en edad reproductiva tienen problemas de esterilidad y existen cerca de un millón de parejas demandantes de asistencia reproductiva. En los últimos años parece que los datos epidemiológicos reflejan un incremento de los problemas de fertilidad en las parejas, posiblemente derivado de múltiples factores; fisiológicos, ambientales y sociodemográficos. Este hecho está teniendo respuesta por parte del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida que pueden solucionar una demanda creciente.

Como sabemos, en nuestro país pocos recursos se orientan hacia temas epidemiológicos y de análisis social. Cuando queremos analizar la situación de un problema bajo un punto de vista global, con cifras nuestras, muchas veces tenemos que utilizar datos de otros países bien analizados y los asumimos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por la no consecución de un embarazo clínico tras 12 meses o más de relaciones sexuales habituales sin anticoncepción (Zegers-Hochschild et al., 2009).

En el mundo, más de 70 millones de parejas tienen problemas de fertilidad (Boivin et al., 2007).

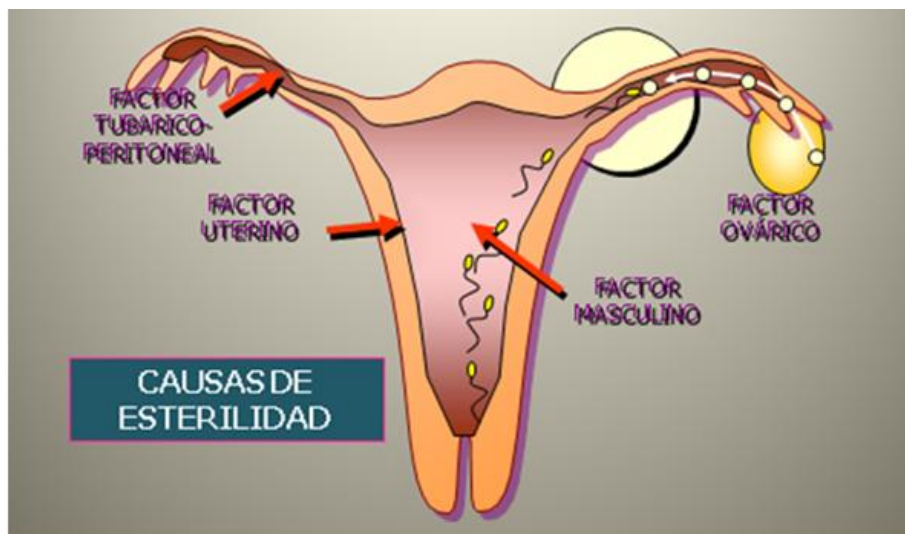
La infertilidad es un problema de la pareja. En aproximadamente el 25% de los casos, el diagnóstico primario es de infertilidad masculina, que además contribuye a otro 15%- 25% de los casos restantes. No se diagnostican el 20% de los casos (Registro SEF, 2014).

Los tratamientos disponibles para la fertilidad son eficaces. En un estudio danés se ha documentado que el 69,4% de las parejas tratadas consigue concebir al menos un hijo en un plazo de 5 años, mientras que solamente el 6,6% de las parejas sin tratamiento lo consiguen (Pinborg et al., 2009).

Según algunos estudios, no inician o no perseveran con el tratamiento, aproximadamente 8 de cada 10 parejas que buscan asistencia médica. El principal motivo mencionado por las parejas que abandonan el tratamiento es el *estrés emocional* (Brandes et al., 2009; Rajkhowa et al., 2006).

En España se estima actualmente en un 3% los nacimientos de hijos mediante TRA (International Committee for Monitoring Assisted Reproductive et al., 2009).

En el presente apartado desarrollaremos los factores relacionados con la esterilidad, dedicando especial atención a las causas femeninas, las cuales constituyen el núcleo de investigación de esta Tesis Doctoral (Fig. 1).



**Figura 1.** Factores fundamentales involucrados en la esterilidad.

- 1.2.1. **Factor Femenino:** entre el 60-65% de los casos de esterilidad se encuentra alguna causa femenina (Registro SEF, 2014).

#### **A. Edad de la mujer**

En el momento actual, y ya desde décadas pasadas, la edad a la que las pacientes buscan su primera gestación se ha ido retrasando en las sociedades desarrolladas.

En diferentes estudios epidemiológicos se demuestra que las parejas posponen la edad a la que buscan el primer embarazo. En Holanda, la edad a la que se tiene el primer hijo ha aumentado desde los 26,5 años en 1985 hasta los 29,4 años en 2008.

Según el último registro del Instituto Nacional de Estadística (INE) la edad media de la mujeres que viven en España al dar a luz a su primer hijo mantiene una suave tendencia creciente, habiendo alcanzado los 31,32 años y situándose las previsiones para el año 2014 en una media de 31,7 años.

Se han podido identificar múltiples factores relacionados con el retraso en la edad de búsqueda de la primera gestación. Entre ellos destacan el retraso en la edad del matrimonio, los segundos matrimonios, el acceso a mejores métodos anticonceptivos y la



espera para tener una relación estable y una situación profesional y financiera seguras (Chuang et al., 2003).

La fecundidad materna desciende con la edad, un declive que se incrementa desde los 35 años en adelante y es más significativo a partir de los 40 años (Tabs et al., 2002).

Este descenso de la fecundidad se atribuye principalmente al envejecimiento y la consiguiente pobre calidad de los ovocitos. El retraso en la búsqueda de la primera gestación ya está teniendo un impacto sobre la población y, de manera más significativa, en aquella que acude a los centros de reproducción asistida. En Estados Unidos, el número de nacimientos de bebés cuyas madres tenían de 40 a 44 años se duplicó entre 1990 y 2002.

Además, la edad materna avanzada también es un factor de riesgo para el aborto espontáneo. Las mujeres de más de 35 años muestran tasas altas de errores meióticos en sus ovocitos, lo que conduce a un aumento de aneuploidías embrionarias. La tasa de aborto en las mujeres mayores de 40 años es del 40%, frente al 14% en pacientes menores de 35 años (Menken et al., 1986).

Está bien documentado que en los tratamientos de reproducción asistida hay un descenso en las tasas de embarazo relacionado directamente con la edad materna. Esto también es aplicable a la concepción natural. La reserva ovárica disminuye con la edad materna, lo que lleva a un menor número de ovocitos recuperados en la punción, a un aumento de los ovocitos con aneuploidías y a una peor calidad ovocitaria (Abdalla et al., 2004; Szamatowicz et al., 1998).

En la consulta de reproducción asistida es fundamental el asesoramiento con respecto a las tasas de gestación y de recién nacido por ciclo y por ciclos acumulados. Este asesoramiento es especialmente importante en las pacientes de edad avanzada. En muchos casos es muy importante el desconocimiento de la población general respecto del hecho biológico del envejecimiento de los ovocitos. Esto hace que sean muchas las mujeres de edad avanzada que acuden a los centros de reproducción con ideas erróneas preconcebidas sobre sus posibilidades de gestación a determinadas edades mediante técnicas de reproducción asistida, y también respecto al hecho de que éstas puedan revertir los efectos del envejecimiento. Un reciente estudio de simulación demostró que las técnicas de reproducción asistida no compensan completamente los años perdidos. Dado que no hay directrices acerca de las técnicas de reproducción asistida en las pacientes de edad avanzada, los expertos en reproducción deben tener una visión global de las complicaciones maternas y

fetales para poder asesorar a las pacientes. En este grupo de pacientes que se someten a tratamientos de reproducción asistida no hay que olvidar la posibilidad de los embarazos múltiples, que aumenta aún más la morbilidad materno-fetal (Kupka et al., 2014).

También tiene una gran importancia el grupo de mujeres solas (sin pareja) o con pareja del mismo sexo que acuden a los centros de reproducción asistida (en aquellos países en los que el tratamiento de estas pacientes es legal). En algunos centros, este grupo alcanza el 50% del total de ciclos de inseminación artificial con semen de donante, y el 30% de las mujeres de este grupo tienen más de 38 años de edad (Ferrara et al., 2000).

La delimitación de edad materna avanzada no está perfectamente definida. Al revisar las publicaciones de diferentes grupos puede observarse que el momento en el que se clasifica a una paciente dentro del grupo de edad materna avanzada no siempre es el mismo. Algunos grupos de investigación consideran como edad materna avanzada a partir de los 35 años, mientras que otros toman los 39 años como punto de corte inferior. Evidentemente, la comparación de poblaciones diferentes puede llevar a conclusiones divergentes. Nosotros consideramos que la edad de 39 años marcaría el comienzo de la edad materna avanzada en los centros de reproducción asistida. Tanto la bibliografía reciente como la prensa ya ofrecen información sobre casos de mujeres embarazadas de más de 45 años de edad. En determinados casos las pacientes de edad avanzada consideran la donación de ovocitos como una alternativa inaceptable y persisten en sus intentos a pesar de las tasas de recién nacido vivo inferiores al 5% (Cetinkaya et al., 2013).

La Comisión Europea ha financiado un reciente trabajo sobre la percepción social entre hombres y mujeres sobre cuál es el límite de edad para tener hijos. Una de las conclusiones de esta revisión es que este límite está considerablemente por debajo de los límites biológicos, y aunque es más estricto para las mujeres que para los hombres, el límite social no es muy diferente en ambos sexos. La edad materna límite osciló entre los 39,3 años en Hungría y los 43,8 años en Austria (Salonia et al., 2012).

## **B. Factor tubárico-peritoneal**

### **▪ Salpingitis crónica**

Es la principal causa de oclusión tubárica, la cual puede ocurrir a nivel de la unión útero-tubárica (intersticial), la región ístmica, o la ampular-fimbria. Puede limitarse a una zona concreta o implicar grandes porciones de la trompa, especialmente en la región

ístmica. Si solamente es la porción intersticial la que permanece ocluida, o existe la obliteración de la porción ístmica, el aspecto exterior de la trompa puede permanecer sin cambios. Sólo rara vez existe un aumento de aspecto nodular en la región ístmica tubárica (Terzic et al., 2010).

Tras la inflamación, la forma del extremo ampular muestra muchas variaciones, desde presentarse como un pequeño penacho de fimbrias acortadas a quedarse sin ningún rastro de las mismas. A veces, un hoyuelo central, poco profundo, puede indicar dónde se hallaba originalmente la apertura distal de la trompa. En otros casos, las fimbrias invertidas y la apertura de la trompa pueden llegar a distinguirse, dando lugar a la llamada "*fimosis*" tubárica. Otra forma de presentación menos frecuente, la "parafimosis", consiste en una constricción medial, por debajo del extremo fímbrico (Hoof, 2007).

A veces, la trompa puede quedar completamente ocluida en un lado, mientras que en el otro lado conserva cierta permeabilidad y generalmente permanecen separadas aunque, en determinados casos, pueden adherirse tanto entre ambas como a la pared posterior del útero, al ligamento ancho, a asas intestinales e incluso al omento mayor.

El nivel de la obstrucción tubárica se puede determinar mediante laparoscopia o por histerosalpingografía (HSG). La correcta interpretación de la HSG requiere de una gran experiencia, y el procedimiento no era inofensivo cuando se utilizaba un medio de contraste no absorbible como el lipiodol®, el cual solía permanecer retenido en la trompa obstruida durante años desencadenando una reacción inflamatoria a cuerpo extraño. La mayoría de los medios de contraste en uso actualmente son hidrosolubles, con lo que por una parte se reduce el riesgo y, por otra, también proporciona una mejor visualización de los pliegues de la mucosa de las trompas. Es importante ser capaz de evaluar la aparición de la arquitectura intratubárica de forma dinámica para determinar bien la extensión del daño en toda su extensión (Hoof, 2007).

A nivel terapéutico, cuando las adherencias pélvicas asociadas son sintomáticas, pueden ser lisadas mediante laparoscopia o laparotomía, con unos resultados a menudo variables o incluso decepcionantes, debido a las recidivas.

#### ▪ **Hidrosálpinx**

Infecciones recurrentes o crónicas anexiales pueden dar lugar a una dilatación quística de la trompa de Falopio que denominamos *hidrosálpinx*, el cual puede presentarse en forma de masa anexial. En su inicio, el contenido, al ser purulento, se denomina

*piosálpinx*, el cual puede espesarse y ser sustituido lentamente por un tejido de granulación, formando a veces calcificaciones y, en raras ocasiones, incluso puede quedar osificado. Sin embargo, lo que suele ocurrir más a menudo es que los componentes sólidos del contenido tubárico se licúen convirtiéndose en un líquido seroso o serosanguinolento, transformándose así gradualmente el piosálpinx en un hidrosálpinx (Torre et al., 2010).

Después de la reabsorción del infiltrado inflamatorio y del tejido degenerado, la pared tubárica se torna delgada y pobre en fibras musculares, adquiriendo un aspecto translúcido. El tamaño del hidrosálpinx es variable, desde mínimo a varios centímetros, pudiendo llegar a perderse casi por completo la anatomía tubárica y haciendo incluso que desaparezcan las fimbrias.

En el estudio histopatológico, cuando realizamos secciones transversales de la trompa afectada, observamos que los pliegues de la mucosa llegan a aplanarse y separarse unos de otros formando unas especies de crestas, borrándose en casos extremos con la pérdida total de su arquitectura, según sea la intensidad y duración del proceso (Torre et al., 2010).

La anterior es la forma de hidrosálpinx conocida como *simple* y puede desarrollarse a lo largo de los años sin causar ninguna manifestación clínica, permaneciendo silente hasta el momento de intentar embarazo. Como regla, los cultivos de gérmenes a partir del fluido quístico suelen ser negativos.

Lo mismo es válido para el *hidrosálpinx pseudofolicular*, que difiere del simple sólo en su sección transversal, donde los pliegues de las trompas pueden haberse conservado hasta cierto punto, pero que al ir creciendo junto a sus crestas y ramas opuestas, van formando un laberinto de espacios huecos que le dan ese aspecto pseudofolicular. Se dice que su causa más frecuente es la gonorrea, pero también puede producirse en salpingitis crónica de otro origen.

La oclusión tubárica en su extremo uterino no siempre es completa, ya que en determinadas ocasiones, la luz tubárica se bloquea a este nivel sólo por los pliegues a modo de válvula pudiéndose abrir si el hidrosálpinx se distiende. Esta condición, que se caracteriza por el escape periódico del contenido tubárico, acompañándose a veces por dolor cólico, es la denominada clásicamente "*hidropesía tubae profluens*" (Perry et al., 1990).

En el hidrosálpinx, las adherencias peritubáricas suelen ser escasas y laxas, por lo que la torsión tubárica suele ser poco frecuente, pero si ocurre, extravasación de sangre en una trompa torsionada transforma el hidrosálpinx en un *hematosálpinx*, que también puede producirse con mayor frecuencia en el embarazo y aborto tubárico (LaCombe et al., 2003).

El diagnóstico tanto de hidrosálpinx como de piosálpinx no siempre es fácil, ya que pueden confundirse, particularmente si son muy grandes, con quistes ováricos, aunque estos últimos suelen ser más móviles. También hay que hacer diagnóstico diferencial con el embarazo ectópico, para lo cual resulta de gran utilidad la determinación de  $\beta$ hCG en suero. Indagando en la anamnesis, con el antecedente de un episodio agudo de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), se suele sospechar el diagnóstico que confirmaremos con la exploración física y las pruebas complementarias de imagen y laboratorio (Moyle et al., 2010).

El tratamiento quirúrgico para un hidrosálpinx (salpinguectomía o salpingooforectomía) suele ser curativo. La neosalpingostomía puede ser considerada cuando la fertilidad se ha de mantener, pero el éxito de este procedimiento es inversamente proporcional al tamaño de la hidrosálpinx, no superando el 15%. Lo más indicado es la fertilización in vitro con transferencia embrionaria (FIV-TE), aunque las tasas de éxito son menores en estas pacientes. Antes de la FIV, la eliminación o desconexión del hidrosálpinx mediante salpinguectomía o salpingocleisis mejora las tasas de implantación y embarazo, siendo más efectiva la primera siempre que sea posible (Chanelles et al., 2011).

#### ▪ **Tuberculosis genital**

En el pasado, la tuberculosis genital llegó a representar casi un 10% de todas las causas de enfermedad inflamatoria pélvica, principalmente en forma de salpingitis y endometritis crónica, considerándose actualmente una enfermedad rara en los Estados Unidos y demás países desarrollados. No obstante, debido fundamentalmente a fenómenos migratorios y a deficiencias higiénicas e inmunológicas, la tuberculosis pulmonar está en constante aumento en dichos países, con lo que es previsible que también aumente la incidencia tuberculosis genital. La tuberculosis es una causa frecuente de enfermedad inflamatoria pélvica crónica e infertilidad en otras partes del mundo y se puede encontrar en los inmigrantes, especialmente los de Asia. África y América Latina. La tuberculosis genital puede ocurrir a cualquier edad, aunque es más frecuente en las mujeres entre los 20 y 30

años. Generalmente, suelen afectarse ambas trompas, mientras que el útero se ve afectado en algo más del 50% (Crochet et al., 2011).

Como regla general, los bacilos llegan a los trompas por la vía hematógena desde un foco primario en el pulmón o los ganglios linfáticos hiliares, desde donde generalmente se propagan al endometrio y con menos frecuencia a los ovarios. Los oviductos son el lugar principal y predominante afectado por la tuberculosis pélvica, cuyos agentes causales pueden ser tanto el *Mycobacterium tuberculosis* como el *Mycobacterium bovis*. En muchas ocasiones la tuberculosis genital cursa clínicamente de forma silente y sólo es diagnosticada durante el estudio de esterilidad. La posibilidad de transmisión sexual de la tuberculosis genital, aunque existe, es muy poco frecuente.

Los cambios histopatológicos en la trompa de Falopio como resultado de una infección tuberculosa varían considerablemente. En las etapas iniciales, la mucosa tubárica puede estar afectada con tubérculos miliares. A nivel peritoneal, la forma de presentación más frecuente es la tuberculosis miliar viéndose afectadas las serosas tubárica, uterina y la superficie ovárica. En casos más avanzados de endosalpingitis tuberculosa, los nódulos miliares confluyen para formar un exudado que también infiltra las capas más externas de la trompa, causando marcado engrosamiento de la pared de las trompas y debido a que el proceso tuberculoso se inicia en focos separados y no de forma difusa, la trompa adquiere un aspecto nodular (en forma de "rosario"), rígido y con una mayor sinuosidad. El infiltrado puede sufrir necrosis caseosa, produciendo una piosálpinx y, en los casos más favorables, el tejido de granulación puede llegar a producir fibrosis, retracción y calcificaciones tubáricas (Ahmadi et al., 2014).

El diagnóstico de la tuberculosis genital es difícil en la mayoría de los casos. Los síntomas más frecuentes suelen ser amenorrea y dolor sordo hipogástrico (35% de los casos); a veces solicitan consejo médico sólo debido a la esterilidad. Los hallazgos en el examen pélvico son normales en aproximadamente el 50% de los casos. Una biopsia endometrial o la demostración de bacilos de la tuberculosis en los cultivos de secreciones uterinas suele ser suficiente para la confirmación diagnóstica (Crochet et al., 2011).

#### ▪ Síndrome adherencial

En la salpingitis crónica la permeabilidad tubárica se pierde a menudo, con lo que la trompa no puede ser visualizada o no llega a drenar sin dificultad a la cavidad peritoneal al realizar la HSG. Ésta debe ser diferenciada de espasmos de la porción ístmica,

que se presentan con frecuencia ofreciendo una resistencia a la insuflación útero-tubárica, que puede ser superada aplicando una presión moderada o en la cromoperubación mediante una laparoscopia bajo anestesia general.

Las adherencias peritoneales de la conexión de la trompa con el ovario y la hoja posterior del ligamento ancho pueden llegar a replegarla y por lo tanto causar esterilidad. Con frecuencia, estas adherencias implican a todos los órganos pélvicos, incluyendo el omento y asas intestinales bajas. Las adherencias están muy vascularizadas inicialmente, pero lenta y progresivamente se va perdiendo dicha vascularización tornándose frágiles, disponiéndose como tela de araña, y sólo en casos raros pueden desaparecer espontáneamente por completo.

El síntoma más llamativo de salpingitis crónica es el dolor, que puede ser continuo o provocado por el estrés, la defecación o el coito, pudiendo agravarse por la hiperemia e inflamación de la fase premenstrual. También puede presentarse dismenorrea, pero más frecuentemente la menstruación alivia el dolor, mejorando durante y después de la misma. La dispareunia es frecuente, sin embargo, el dolor intermenstrual se presenta ocasionalmente.

Las mujeres con anexitis crónica suelen ser estériles. Si las trompas se repermeabilizan, el embarazo ectópico se produce con cierta frecuencia debido a la peristalsis deteriorada, estenosis, pérdida de la función ciliar normal y la presencia repliegues tubáricos. Las técnicas de reproducción asistida (TRA) que omiten la trompa dañada pueden dar lugar a la concepción, pero estas pacientes tienden a seguir teniendo tasas más altas de lo normal tanto de fallo de implantación como de aborto (He et al., 2010).

El diagnóstico diferencial de la anexitis crónica hay que hacerlo con quistes ováricos y paraováricos, otras tumoraciones anexiales, apendicitis agudas y crónicas y con el embarazo ectópico, para lo cual, aparte de una correcta anamnesis y exploración física, dispondremos de pruebas de imagen (ecografía, RNM y TAC) y laboratorio (hemograma, PCR, VSG,  $\beta$ hCG, etc.).

A veces, se hace necesario recurrir a la laparoscopia o laparotomía, bien para completar el diagnóstico o bien para intentar resolver las posibles complicaciones o la evolución desfavorable tras el tratamiento médico y, por último, para intentar mejorar las tasas de embarazo previo a TRA (Johnson et al., 2010).



### C. Endometriosis

Se define como una enfermedad caracterizada por la presencia de tejido de aspecto endometrial fuera de la cavidad uterina, de etiología desconocida, que induce una reacción inflamatoria crónica. Se trata de un endometrio con unas características especiales (eutópico y ectópico): produce estrógenos, ya que expresa aromatasa, es resistente a la acción de la progesterona, existe una inflamación local y produce citoquinas. En el 50% de los casos es una enfermedad progresiva.

Una de las hipótesis más aceptadas sobre el mecanismo de aparición de la enfermedad es la menstruación retrógrada que se observa en el 90% de las mujeres y explicaría en parte la etiopatogenia de la endometriosis peritoneal y ovárica.

El tejido endometriósico tiene dependencia hormonal del ciclo menstrual, produciéndose sangrado y desprendimiento del mismo con la menstruación. Tiene capacidad para crecer, infiltrar e incluso diseminarse de forma similar al tejido tumoral, pero su transformación maligna es muy rara.

La incidencia y prevalencia son difíciles de estimar. La prevalencia de la endometriosis afecta al menos a un 10% de la población femenina en edad fértil, y que esta proporción asciende al 30-50%, si consideramos tan solo a mujeres en ese mismo rango de edad que presenten problemas de infertilidad-esterilidad o dolor pélvico crónico (Rogers et al., 2009). La prevalencia de endometriosis en mujeres sometidas a laparoscopia por infertilidad, presenta un rango que va desde el 2.1% hasta el 77.1%, según una recopilación de 52 trabajos, con una media del 26,13% (Matorras et al., 2001).

La clínica es muy polimorfa y precisa de un abordaje tanto individualizado como multidisciplinar.

La clasificación de la endometriosis más utilizada en la actualidad continúa siendo la de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) que se realiza en función de la localización de lesiones, su diámetro, profundidad y densidad de las adherencias determinadas por laparoscopia, otorgando una serie de puntos en función de estos parámetros ("Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996," 1997).



A modo de resumen, la endometriosis se clasifica en:

- *Estadio I* o mínima: implantes aislados y sin adherencias.
- *Estadio II* o leve: implantes superficiales menores de 5 cm. adheridos o diseminados sobre la superficie del peritoneo y ovarios.
- *Estadio III* o moderada: implantes múltiples superficiales o invasivos. Adherencias alrededor de las trompas o periováricas, que pueden ser evidentes.
- *Estadio IV* o severa: implantes múltiples, superficiales y profundos, que incluyen grandes endometriomas ováricos. Usualmente se observan adherencias membranosas extensas.

Entre las manifestaciones clínicas encontramos un 20-30% asintomática, **dolor hipogástrico** (dismenorrea, dispareunia, dolor pélvico crónico), trastornos menstruales presentes en un 20-30% (ciclos y menstruaciones irregulares), esterilidad (alteración anatómica, alteración hormonal, alteración del líquido peritoneal, alteración de la receptividad endometrial y alteración de la calidad ovocitaria) y otros síntomas (rotura de quiste, hematuria, tenesmo, disquecia, rectorragia, hemoptisis, etc.).

El diagnóstico de endometriosis se realiza mediante anamnesis, exploración clínica (dolor y nódulos o masas), marcadores tumorales séricos (CA-125 y otros), pruebas de imagen (ecografía, RNM, TAC) y laparoscopia (diagnóstica y terapéutica).

En cuanto a la relación de la endometriosis con la fertilidad, existen alteraciones en todos los niveles de la función reproductiva femenina. La función ovárica se ve afectada con una disminución de la reserva folicular que se traduce en una disminución del número de ovocitos recuperados por punción y un aumento de FSH y estradiol basales (día 2-5 del ciclo); disminución de la inhibina B, sobretodo en estadio III y IV; más alteraciones hormonales (disminución del estradiol, alteración del pico de LH) en estadios I y II; alteraciones de células de la granulosa con un aumento de endotelina 1 (inhibidor de la esteroidogénesis), disminución de la LH en líquido folicular, disminución de la progesterona y alteración en la actividad aromatasa; alteraciones paracrinas detectadas en líquido folicular (disminución del VEGF, aumento de progesterona e IL-6 alterando la maduración del ovocito). La calidad ovocitaria se ve afectada ya que disminuye la tasa de embarazo con ovocitos propios, lo cual no sucede si se utilizan ovocitos de donante, también se produce un aumento de la apoptosis en las células de la granulosa al aumentar el estradiol afectándose la foliculogénesis. La tasa de fecundación disminuye al afectarse la calidad ovocitaria y no está aclarado el efecto tóxico que puede desempeñar el líquido peritoneal de estas pacientes a este nivel. Por último, la tasa de implantación embrionaria

puede disminuir por defectos endometriales como la disminución de la expresión de integrinas como avb-3 (marcador de receptividad endometrial) o aumento de ICAM-1, interferencia con la señal de IGF-1 para el desarrollo embrionario, y también afectándose la contractilidad uterina por alteración del arquimiometrio (Ding et al., 2010; Ekart et al., 2013; Filippi et al., 2014; Goud et al., 2014).

En las pacientes con endometriosis el manejo y el enfoque terapéutico difiere notablemente si el problema a tratar es el dolor o la infertilidad. Mientras que para el tratamiento del dolor con frecuencia las terapias hormonales y las cirugías radicales pueden ser una buena opción, estas estrategias habitualmente dificultan la consecución del embarazo. Por otra parte, los tratamientos de fertilidad se basan en la máxima conservación de la función ovárica y ello con frecuencia es un obstáculo para el tratamiento del dolor.

Las endometriosis avanzadas, con importantes alteraciones anatómicas (tubáricas, ováricas y adherenciales), tienen una clara relación con la infertilidad (Recomendación grado C) (ESHRE). En cambio, la relación de la endometriosis I y II con la infertilidad es menos evidente.

No se ha demostrado que la endometriosis I se asocie a una inferior tasa de embarazo, si bien se ha descrito una tendencia a unas tasas de embarazo un 30% inferiores (Recomendación grado C).

La supresión de la función ovárica para mejorar la fertilidad en la endometriosis mínima-leve no es efectiva y no debiera ofrecerse para esta indicación aislada. Los trabajos publicados no se refieren a las formas más avanzadas de la endometriosis (Recomendación grado A).

Respecto al tratamiento laparoscópico de la endometriosis I y II, en un estudio randomizado se encontró una mejoría significativa en las tasas de embarazo, mientras que en otro con un diseño similar, no se encontraron diferencias. El meta-análisis resultante pone de manifiesto un beneficio de la realización de la ablación/adhesiolisis en la endometriosis I y II (Ozkan et al., 2008). No obstante, se ha calculado que para obtener un embarazo se requeriría la realización de 7,7 laparoscopias con adhesiolisis/ablación, siendo ésto desproporcionado para algunas pacientes. La ablación de las lesiones endometriósicas más la adhesiolisis para mejorar la fertilidad en la endometriosis mínima-leve es efectiva comparada con la sola laparoscopia diagnóstica (Recomendación grado A).

Diferentes estudios no randomizados sobre cirugía en la endometriosis severa comunican un aumento en las tasas de embarazo tras la cirugía reparadora frente a un casi 0% en ausencia de tratamiento. Un metanálisis de un estudio quasi randomizado y cinco estudios de cohortes, concluyó que la cirugía podía ser útil para mejorar las tasas de embarazo, comparada con la ausencia de tratamiento o el tratamiento médico, pero la

heterogeneidad de estos estudios limita la validez de esta conclusión. No se dispone de estudios randomizados controlados ni meta-análisis para responder a la pregunta de si la escisión quirúrgica de la endometriosis moderada-grave aumenta la tasa de embarazo. Atendiendo a tres estudios parece existir una correlación negativa entre estadio de la endometriosis y la tasa acumulativa de embarazo espontáneo tras la extirpación quirúrgica de la endometriosis, pero la significación estadística se alcanzó en un solo trabajo (Recomendación grado B) (ESHRE).

En las mujeres con endometriosis III/IV y sin otros factores identificables de infertilidad se recomienda la cirugía conservadora por laparoscopia, y presumiblemente también por laparotomía (Recomendación grado B).

Las TRA utilizadas en la endometriosis son la **IIU** y la **FIV/ICSI** dependiendo de la edad de la mujer, el factor masculino y la permeabilidad tubárica.

Respecto a la IIU, diferentes estudios randomizados han puesto de manifiesto la eficacia de la estimulación de la ovulación con o sin inseminación intrauterina (IIU) en el aumento de las tasas de embarazo en la infertilidad asociada a endometriosis, en ausencia de importantes distorsiones de la anatomía pélvica o de factor masculino asociado. Al comparar diferentes combinaciones, los mejores resultados se obtuvieron con inseminación intrauterina y gonadotropinas. Sin embargo, se carece de estudios relativos a la eficacia de la inseminación intrauterina en los estadios avanzados. El tratamiento con IIU en la endometriosis mínima-leve mejora la fertilidad: la IIU con estimulación ovárica es eficaz pero el papel de la IIU sola es desconocido (Recomendación grado A). Las tasas de embarazo en la IIU son más bajas en las pacientes con endometriosis que en los controles (Recomendación grado A).

Respecto a la FIV/ICSI, es un tratamiento apropiado en la endometriosis, especialmente si hay afectación de la función ovárica, si hay factor masculino asociado y/o si otros tratamientos han fallado (Recomendación grado B) (ESHRE, SEF).

La relación entre endometriosis y tasas de embarazo en la FIV no está clara, variando según los criterios de inclusión de las pacientes con endometriosis y de la definición de qué se considera como grupo control. Algunos estudios han reseñado inferiores tasas de éxito en la FIV indicada por endometriosis respecto a las que se realizan por factor tubárico o por esterilidad de origen desconocido (EOD). Un meta-análisis de 22 estudios no randomizados encontró peores tasas de embarazo que en el factor tubárico (Recomendación grado A), mientras que en otros estudios no han encontrado diferencias. En los diversos registros nacionales, las tasas de embarazo en pacientes con endometriosis son muy similares a las de las pacientes sin endometriosis (Barnhart et al., 2002).

Las mujeres con endometriosis avanzadas tienen peores resultados en la FIV que las endometriosis leves (Recomendación grado A).

No existe consenso respecto al manejo de los endometriomas antes de realizar la FIV. Una revisión sistemática y meta-análisis de 20 estudios concluyó que el tratamiento quirúrgico de los endometriomas no tenía efecto en las tasas de embarazo en la FIV ni en la respuesta ovárica comparado con la ausencia de tratamiento (Recomendación grado C). Únicamente uno de dichos trabajos era randomizado, el cual tampoco puso de manifiesto diferencias significativas al estudiar endometriomas de 1 a 6 cm (Recomendación grado B).

Si bien es objeto de controversia, se recomienda la quistectomía ovárica cuando el diagnóstico ecográfico ofrece dudas. En teoría la quistectomía tiene la ventaja de mejorar el acceso a los folículos y disminuir el riesgo de infección (aunque es excepcional). Si bien en los endometriomas a tensión la quistectomía pudiera mejorar la respuesta ovárica, en el resto de endometriomas la respuesta ovárica puede empeorar tras la cirugía. La cirugía conlleva el riesgo (muy infrecuente) de pérdida del ovario. En caso de cirugías previas los riesgos quirúrgicos se incrementan (Alborzi et al., 2007).

La quistectomía laparoscópica parece ser superior en términos de tasas de embarazo que la escisión más drenaje (Recomendación grado A). Sin embargo, un estudio no puso de manifiesto diferencias en las tasas de embarazo después de estimulación ovárica comparando quistectomía y drenaje) (Kennedy et al., 2005).

El tratamiento con agonistas de la GnRH los 3-6 meses previos a la FIV o ICSI debe ser considerado en las mujeres con endometriosis, ya que multiplica por cuatro la probabilidad de embarazo (Recomendación grado A). Un reciente estudio comunica que el tratamiento durante los dos meses previos a la FIV o ICSI se asocia a una tendencia a unas mejores tasas de embarazo (Recomendación grado C) (Dunselman et al., 2014).

## **D. Factor ovárico-endocrino**

### **▪ Fallo ovárico precoz**

Dada la trascendencia del ovario nos detendremos en el fallo ovárico precoz o insuficiencia ovárica prematura (IOP).

La insuficiencia ovárica prematura (IOP) es una de las causas de hipogonadismo en la mujer. Se distinguen dos tipos de hipogonadismo. El hipogonadismo hipogonadótropo, es decir, con gonadotropinas de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) normales o bajas, es de origen central, hipotalámico o hipofisario.

El hipogonadismo hipergonadótropo o IOP, con gonadotropinas aumentadas, es de origen periférico, es decir, ovárico (Panay et al., 2009).

La IOP es una depleción prematura de las funciones ováricas. Se define por una deficiencia ovárica periférica, caracterizada por una amenorrea primaria o secundaria que aparece alrededor de los 40 años de edad y que se asocia a una concentración de FSH superior a 30 mUI/mL. La forma más grave se manifiesta por impuberismo con amenorrea primaria, es decir, falta de menstruación en la pubertad, mientras que las formas de aparición pospuberal se caracterizan por una amenorrea secundaria asociada a un desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, la mayoría de las veces normal, con presencia de oleadas de calor. La insuficiencia ovárica es un proceso ineluctable en la especie humana y se produce, en promedio, alrededor de los 51 años (menopausia); la concepción es poco probable después de los 49 años. Con el paso de tiempo, la edad promedio de la menopausia se mantiene estable a pesar del aumento de la esperanza de vida, al contrario que la edad de la menarquia, que ha disminuido claramente desde principios del siglo XX (Panay et al., 2009).

Alrededor del 10% de las mujeres son menopáusicas entre los 40-45 años y el 88%, después de los 45 años. La IOP es una menopausia que aparece precozmente antes de los 40 años. Sin embargo, debe preferirse el término insuficiencia ovárica prematura al de menopausia precoz. La edad de la menopausia estaría muy influida por los factores genéticos, tal como lo sugiere un estudio reciente relativo a 600 pares de gemelas. Los factores ambientales, como el tabaco, también pueden modificar en gran medida la edad de la menopausia. La IOP está lejos de ser excepcional y su prevalencia es de alrededor del 2% de la población femenina. Alcanza el 1% a los 40 años y el 0,1% a los 30 años. Entre las pacientes que presentan una amenorrea primaria, el porcentaje de insuficiencias ováricas es del 10-28% y entre las que presentan una amenorrea secundaria, del 4-18%. Esta enfermedad, relativamente frecuente, acarrea serias consecuencias físicas, funcionales y psicológicas. Al respecto, la carencia estrogénica causada por la insuficiencia ovárica tiene consecuencias metabólicas y cardiovasculares y determina un inicio rápido de la osteoporosis en mujeres jóvenes. Además, la ausencia de ciclos ovulatorios termina de forma ineluctable en una esterilidad casi definitiva. Por otra parte, las repercusiones psicológicas de la amenorrea, sobre todo cuando se asocia a impuberismo, son considerables.

A menudo, la exploración clínica, hormonal y de citogenética básica no permite detectar la causa, salvo aquellas causas clásicas como el síndrome de Turner, la quimioterapia y la radioterapia (van den Akker et al., 2014).

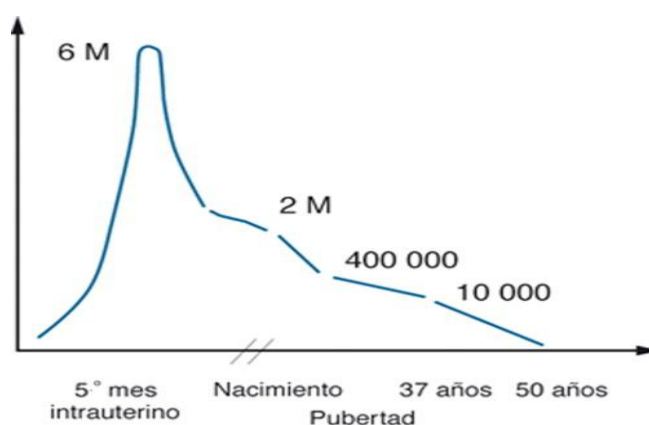
En estos últimos años se han producido avances espectaculares sobre la comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares del funcionamiento ovárico, lo cual ha permitido levantar gradualmente el velo de estas formas, hasta entonces idiopáticas, de IOP.

En el ovario adulto, hasta el estadio preovulatorio el ovocito todavía está bloqueado en la primera división de la meiosis, pero aumenta de volumen hasta alcanzar 120  $\mu\text{m}$  de diámetro. Al inicio de un ciclo menstrual, cada ovario tiene 1-8 folículos cavitarios de 3-5 mm de diámetro que se han desarrollado con más rapidez que los otros al final del ciclo precedente. La LH estimula la producción de andrógenos por las células de la teca. Bajo la influencia de la FSH, cuyo nivel plasmático aumenta de forma gradual, estos folículos continúan con un crecimiento rápido. La FSH estimula la actividad aromatasa, que produce estradiol a partir de los andrógenos suministrados por las células de la teca interna. También estimula la producción del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), el cual, asociado al estradiol, estimula la multiplicación de las células de la granulosa. La FSH también favorece la formación de sus propios receptores en la membrana de las células del folículo, lo que a su vez aumenta su sensibilidad a esta hormona. Las células foliculares secretan al mismo tiempo una cantidad creciente de inhibina, la cual que ejerce un retrocontrol sobre la producción de FSH. El folículo que acumula más receptores de la FSH sigue siendo sensible a bajas dosis de FSH y se convierte en el folículo dominante, seleccionado para continuar con un crecimiento acelerado hasta el estadio preovulatorio. Los otros folículos entran en atresia.

En cuanto a la fisiopatología de la IOP, es clásico hablar del proceso de envejecimiento ovárico (“*ovarian aging*”) cuando la reserva folicular desciende y la ovulación se hace menos frecuente. Se produce una alteración progresiva de la foliculogénesis (la función exocrina del ovario) y de la esteroidogénesis (la función endocrina) con elevación de los niveles de gonadotropinas (sobre todo FSH). La secreción de estradiol suele mantenerse normal durante algunos años antes de la hipoestrogenemia. En este período, la fase folicular se abrevia y el intervalo entre los ciclos disminuye. El estadio siguiente se caracteriza por el agotamiento folicular que dará paso a la menopausia.

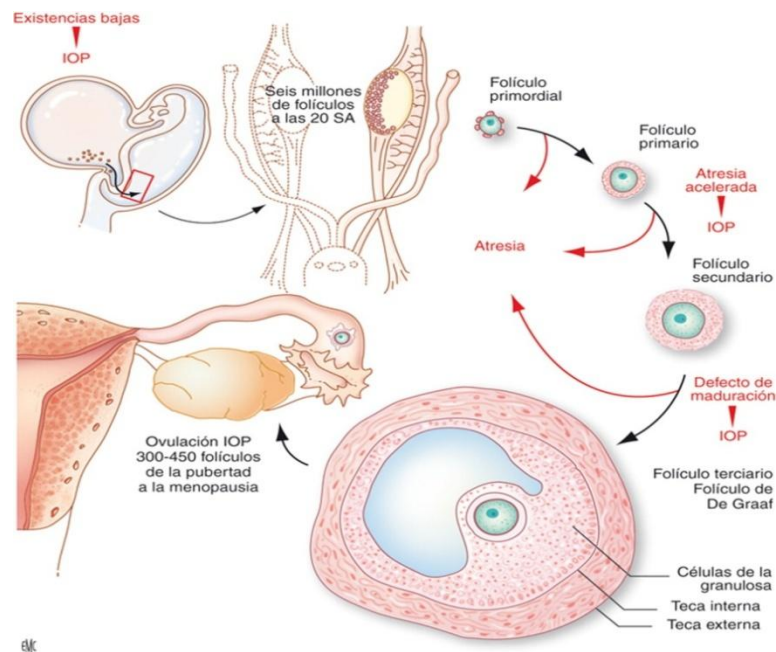
La IOP corresponde a la pérdida precoz de la función ovárica antes de los 40 años de edad (Assumpção, 2014).

Antes de considerar los mecanismos de la insuficiencia ovárica, es necesario recordar la fisiología del desarrollo folicular. La **foliculogénesis** es un proceso de crecimiento y maduración de los folículos ováricos desde el estadio primordial hasta el estadio preovulatorio. El estadio inicial o folículo primordial está formado por un ovocito o célula germinal rodeada por una capa de células de la granulosa. Durante la vida fetal se forma de manera definitiva una reserva considerable de folículos primordiales. Desde la pubertad hasta la menopausia, alrededor de 500 folículos maduros alcanzarán el estadio de la ovulación y los demás sufrirán una degeneración: ésta es la atresia folicular o muerte celular programada. La apoptosis es masiva durante la vida fetal y luego continúa hasta la menopausia. En las primeras veinte semanas de vida fetal, las células germinales se multiplican con rapidez hasta alcanzar un número máximo de 6-7 millones (Fig. 2). Durante los tres últimos meses de la vida fetal, se destruye el 66% de estas células. Los ovarios tienen alrededor de 2 millones de ovocitos en el momento del nacimiento, 400.000 en la pubertad y 10.000 a los 40 años. Durante la última década de la vida reproductiva, la destrucción folicular se acelera y en la edad de la menopausia, alrededor de los 50 años, muy pocos folículos están presentes en el tejido ovárico.



**Figura 2.** Evolución del número de células germinales en el ovario durante la vida en la mujer (M = millones).





**Figura 3.** Mecanismos fisiopatológicos de la insuficiencia ovárica prematura (IOP).  
SA: semana de amenorrea.

En teoría, la IOP puede ser secundaria a:

- Una depleción primaria de las existencias de folículos primarios (reserva de folículos primordiales demasiado baja).
- Una atresia folicular o apoptosis acelerada.
- Un defecto de selección.
- Un bloqueo de la maduración folicular (Fig. 3).

Las hipótesis actuales se refieren a un «control de calidad» que permitiría eliminar los folículos cuyos ovocitos presentan anomalías meióticas, de modo que una apoptosis acelerada sería entonces la consecuencia de una frecuencia inusualmente elevada de accidentes meióticos (Holt et al., 2014).

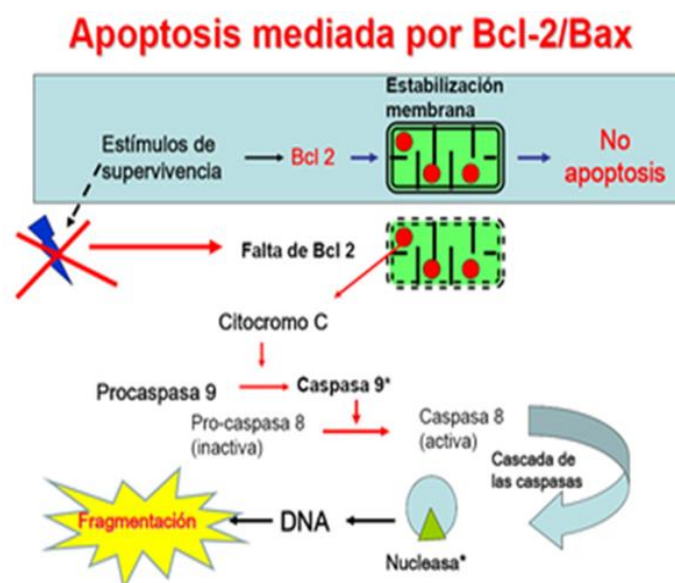
Una segunda teoría presupone la existencia de un fenómeno natural de autosacrificio de los ovocitos, el cual permite cada vez la selección de un folículo destinado a sobrevivir entre cierto número de folículos en competición. Si el número de folículos que compiten en cada ciclo está anormalmente elevado, la reserva ovárica se agota mucho más rápido.



En el plano molecular, la apoptosis ovárica sería, al menos en parte, la consecuencia de una perturbación de la interacción entre el ovocito y las células de la granulosa, cuyos actores son los factores de crecimiento y las citocinas que interactúan con los reguladores de la familia del *gen Bcl-2* (Christin-Maitre et al., 2002).

A pesar de todas estas hipótesis, la fisiopatología de esta afección sigue siendo mal conocida.

La *apoptosis* es el destino más frecuente de un folículo ovárico, puesto que más del 99% de los folículos en crecimiento degenera (Fig. 4). En el mecanismo de muerte celular programada hay distintos factores implicados. Se han descrito dos formas de *atresia folicular*: una que afecta al ovocito de los folículos preantrales y otra que tiene por diana las células de la granulosa de los folículos antrales. La apoptosis está controlada por proteínas que orientan la célula hacia la vida o la muerte. Algunas proteínas, como Bax, son inductoras de la apoptosis, mientras que otras, como la Bcl-2, son antiapoptóticas (Christin-Maitre et al., 2002).



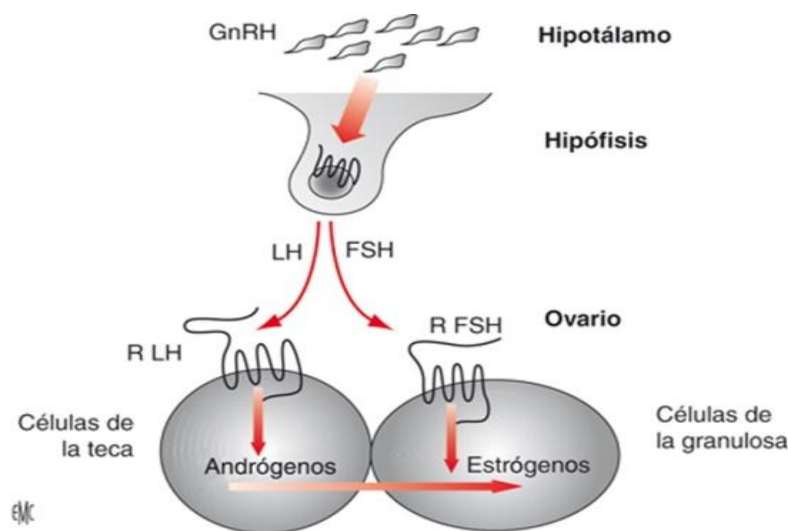
**Figura 4.** Mecanismo de acción molecular de la apoptosis celular.

La *foliculogénesis* puede ser dividida en dos fases. La primera permite el reclutamiento inicial y el crecimiento de una cohorte de folículos primordiales hasta el estadio de folículos preantrales. El proceso de crecimiento folicular basal es continuo y lento. Empieza mucho antes del inicio de la pubertad. La duración del reclutamiento inicial

no se conoce con precisión; es de más de 220 días, es decir, unos ocho ciclos. En esta primera fase, al ser reclutado, el folículo debe atravesar los estadios de folículo primario, secundario y preantral. Antes de la pubertad, los folículos, que abandonan la reserva de los folículos quiescentes, evolucionan inevitablemente hacia la atresia. A partir de la pubertad, un número reducido de folículos preantrales escapa a la atresia para iniciar el reclutamiento cíclico. Los principales mecanismos que controlan la iniciación del crecimiento folicular serían factores intraováricos. El factor Steel, denominado también ligando de kit, podría desempeñar un papel considerable en el crecimiento folicular inicial. Este factor es expresado por las células de la granulosa de los folículos en crecimiento (Hutt et al., 2006). Su receptor, c-kit, de la familia de las tirosinas cinasas, es expresado por los ovocitos y las células de la teca. El ovocito cumpliría una función principal en la foliculogénesis por medio de proteínas como el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9) y su homólogo GDF-9B (también denominada proteína morfogenéticamente ósea 15 [BMP-15]), que son homodímeros de la familia de los factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) secretados por los ovocitos. El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de GDF-9 es expresado por los ovocitos en todos los estadios del desarrollo folicular, salvo en el estadio de folículo primordial. La comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa es indispensable para el desarrollo del folículo preantral. Entre el ovocito y las células de la granulosa hay uniones gap que permiten tal comunicación. Estas uniones son conglomerados de canales intercelulares formados por conexinas (Sun et al., 2010).

La segunda fase o reclutamiento cíclico promueve la incorporación y el crecimiento del folículo dominante durante la primera parte del ciclo ovárico. Tras la pubertad, un número limitado de folículos antrales evoluciona hacia el estadio preovulatorio bajo el efecto cíclico de las gonadotropinas. La apoptosis también está presente en esta segunda fase y en todas las etapas del desarrollo folicular. El crecimiento folicular terminal, que corresponde a la fase folicular del ciclo ovárico, depende de las gonadotropinas. Su duración normalmente es de 14 días. Al principio de la fase folicular, 1-15 folículos antrales ingresan en la reserva de los folículos seleccionables y sólo uno avanza hacia el estadio preovulatorio: es el **folículo dominante**. El aumento de FSH al principio de la fase folicular permite el reclutamiento del folículo dominante. Por el efecto de la FSH se produce una proliferación de las células de la granulosa de este folículo. Las células de la granulosa expresan el receptor de la FSH (R-FSH) y las células de la teca hacen lo propio con el receptor de la LH (R LH). De acuerdo con la teoría bicelular (Fig. 4), las células de la teca,

estimuladas por la LH, secretan los andrógenos que van a ser transformados en estrógenos por las células de la granulosa debido a la acción de una enzima, la aromatasa, cuya actividad es estimulada por la FSH. Al final de la fase folicular, las células de la granulosa del folículo preovulatorio expresan igualmente R-LH y el crecimiento del folículo dominante depende de la LH. Aunque las gonadotropinas son el factor de supervivencia más importante de los folículos preovulatorios, otros mecanismos hormonales intrafoliculares podrían desempeñar un papel nada desdeñable (Foxcroft et al., 1985). Así pues, GDF-9 es un factor paracrino secretado por los ovocitos de los folículos preovulatorios que regula algunas enzimas de las células de la granulosa implicadas en la expansión del cúmulo y en el mantenimiento de un contexto ovocítico óptimo e indispensable para una ovulación normal (Craig et al., 2007).



**Figura 4.** Eje H-H-O. Teoría bicelular. GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; LH:hormona luteinizante; FSH: hormona foliculoestimulante; R: receptor.

En cuanto a la etiología, en más del 90% de los casos, la causa de la IOP es desconocida (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Causas de la insuficiencia ovárica prematura

<b>Yatrogénicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cirugía pélvica</li> <li>- Irradiación pélvica</li> <li>- Quimioterapia</li> </ul>
<b>Autoinmunitarias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aislada</li> <li>- Asociada a: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipotiroidismo</li> <li>- E. Addison</li> <li>- Diabetes tipo I</li> <li>- Miastenia</li> <li>- Vitíligo</li> <li>- Lupus ES</li> </ul> </li> </ul>
<b>Tóxicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Galactosemia congénita</li> <li>- Tabaco</li> </ul>
<b>Genéticas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cromosómicas</li> <li>- Génicas</li> </ul>

**Tabla 2.** Causas de la insuficiencia ovárica prematura en la especie humana

<b>Enfermedades</b>	<b>Mecanismos</b>
<b>Causas genéticas</b>	
Síndrome de Turner	Aceleración de la apoptosis
Disgenesias gonadales	Aceleración de la apoptosis
Mutación del gen <i>D14</i>	Aceleración de la apoptosis
Mutación del gen <i>XPNPSP2</i>	Aceleración de la apoptosis
Premutación del gen <i>FMR1</i>	Aceleración de la apoptosis
Galactosemia	Aceleración de la apoptosis
Síndrome de Perrault	Aceleración de la apoptosis
Ataxia-telangiectasia	Disminución de la reserva de folículos primordiales
Mutación inactivadora del gen del receptor de la FSH	Bloqueo de la maduración folicular
Mutación inactivadora del gen del receptor de la LH	Bloqueo de la maduración folicular
Déficit de 17 $\alpha$ -hidroxilasa	Bloqueo de la maduración folicular
Déficit de 17-20 desmolasa	Bloqueo de la maduración folicular
Mutación del gen <i>STAR</i>	Bloqueo de la maduración folicular
Déficit de aromatasas	Bloqueo de la maduración folicular
BPES	Bloqueo de la maduración folicular
<b>Causas autoinmunitarias</b>	
APECED o poliendocrinopatía de tipo I	Bloqueo de la maduración folicular
Poliendocrinopatía de tipo II	Bloqueo de la maduración folicular
Insuficiencia ovárica asociada a otras enfermedades autoinmunitarias	Bloqueo de la maduración folicular
Insuficiencia ovárica aislada	Bloqueo de la maduración folicular
<b>Causas tóxicas</b>	
Quimioterapia	Aceleración de la apoptosis
Radioterapia	Aceleración de la apoptosis
¿Yodo radiactivo?	Aceleración de la apoptosis
¿Tabaco?	Aceleración de la apoptosis

LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculoestimulante; BPES: síndrome de blefarofimosis, ptosis y epicantero inverso; APECED: síndrome de poliendocrinopatía autoinmunitaria, candidiasis y distrofia ectodérmica.

Entre las *causas genéticas* de IOP se ha descrito una enfermedad autosómica recesiva rara y grave: la *ataxia-telangiectasia*. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son variadas y asocian una degeneración neurológica progresiva (ataxia cerebelosa, coreoatetosis, disfunción oculomotora, etc.), telangiectasias oculares y cutáneas, un déficit inmunitario, una mayor sensibilidad a las radiaciones ionizantes y el desarrollo frecuente de linfomas (en el 10-15% de los casos). Las pacientes afectadas por este síndrome presentan también una IOP con ovarios de pequeño tamaño, desprovistos de folículos primordiales. La ataxia-telangiectasia es una enfermedad de evolución desfavorable y progresiva que produce la muerte en la segunda o tercera década de la vida. El gen de la ataxia-telangiectasia, ATM, fue clonado en 1995 por clonación posicional. Está situado en el cromosoma 11q22-23. La proteína ATM está implicada en la regulación del ciclo celular. Se han detectado mutaciones del gen ATM en más de cien pacientes (Warenik-Szymankiewicz et al., 2005).

El bloqueo de la maduración folicular produce un tipo de insuficiencia ovárica denominado «*síndrome de resistencia a las gonadotropinas*». En este caso, las pacientes pueden tener ovarios de tamaño normal, folículos visibles en la ecografía y elevación de las gonadotropinas séricas.

La mutación del receptor de la FSH puede originar una IOP. El gen del receptor de la FSH se localiza en 2p11. Como hallazgo importante fue el primer caso de mutación inactivadora del gen del receptor de la FSH que se descubrió. La mutación Ala189Val, que afecta al dominio extracelular del receptor, ha sido identificada en 22 pacientes finlandesas afectadas por una IOP familiar. Las pacientes homocigotas para la mutación Ala189Val presentan una amenorrea primaria con ovarios de tamaño por debajo de lo normal y folículos bloqueados en el estadio preantral (Doherty et al., 2002). En otros países se buscaron de forma sistemática mutaciones del gen del receptor de la FSH en pacientes afectadas por una IOP. Sin embargo, la fuerte prevalencia de esta mutación se presentaría de forma específica en Finlandia; se han detectado muy pocos casos en los otros países en los que se ha investigado. Al respecto, en Inglaterra, Estados Unidos, Japón y Alemania los estudios fueron negativos. En Francia se identificaron tres casos. Una paciente con amenorrea secundaria era portadora de una mutación heterocigótica compuesta (Ile160Thr y Arg573Cys), responsable de una pérdida de función parcial del receptor de la FSH. Otra paciente también tenía una mutación heterocigótica compuesta (Asp224Val y

Leu601Val), pero presentaba una amenorrea primaria y un desarrollo puberal normal (Binder et al., 2012).

La mutación del receptor de la LH ocasiona a veces IOP. El gen del receptor de la LH también se localiza en 2p11. Se han demostrado varios casos de mutación inactivadora del gen del receptor de la LH en familias en las que previamente se había diagnosticado pseudohermafroditismo masculino. Las mujeres afectadas presentaban una amenorrea primaria y secundaria con desarrollo mamario normal. Las mujeres con una mutación inactivadora en estado heterocigoto eran normales y fértiles. En cambio, las mutaciones inactivadoras, en estado homocigoto, producen en la mujer un cuadro clínico caracterizado por espanomenorrea o por una amenorrea primaria o secundaria. Los folículos ováricos se desarrollan hasta el estadio antral, tras lo cual sufren una degeneración quística por falta de ovulación. Las concentraciones circulantes de LH se mantienen elevadas, mientras que la concentración de FSH es menor que en las demás causas de IOP y la estradiolema es normal en la fase folicular, lo cual permite el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la proliferación endometrial. La estradiolema, en cambio, disminuye en la fase luteínica debido a la falta de cuerpo lúteo (Nair et al., 2005).

En casos muy infrecuentes de anomalías enzimáticas puede producirse un bloqueo de la maduración folicular. Las pacientes portadoras de un déficit de *17 $\alpha$ -hidroxilasa* presentan una amenorrea primaria e hipertensión arterial con hipopotasemia. Respecto a estas mujeres se han informado algunos casos de obtención de embriones a pesar de las concentraciones bajas de estradiol. La sintomatología clínica del déficit de *17-20 desmolasa* es muy similar, puesto que el citocromo P450c17 cataliza la actividad de la *17 $\alpha$ -hidroxilasa* y de la *17-20 desmolasa* (Ckasalow et al., 1986).

Además, la insuficiencia ovárica puede aparecer en caso de mutación del gen codificador de la proteína de la regulación aguda de la esteroidogénesis (*Star*). Esta proteína, implicada en el transporte del colesterol, cuando sufre una mutación puede causar una insuficiencia suprarrenal por hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea. En las variedades graves, los esteroides suprarrenales y gonadales no son sintetizados y las pacientes presentan amenorrea primaria y falta de desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. En las anomalías enzimáticas se han detectado algunos casos de mutaciones de la aromatasa, que es la enzima que permite la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos. Las pacientes afectadas por el déficit tienen una amenorrea primaria con ovarios grandes y multiquísticos (Bose et al., 2000).

El papel de la **autoinmunidad** en la patogénesis de la insuficiencia ovárica se sospecha desde hace mucho tiempo debido a la asociación frecuente entre la IOP y otras anomalías autoinmunitarias, en especial el hipotiroidismo. Aparte de las poliendocrinopatías familiares, la insuficiencia ovárica puede asociarse a miastenia, lupus, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn (Hoek et al., 1997).

Las *poliendocrinopatías autoinmunitarias* se definen por la presencia, en una misma persona, de por lo menos dos enfermedades endocrinas de origen autoinmunitario. Se distinguen dos formas: la poliendocrinopatía de tipo I o síndrome de poliendocrinopatía autoinmunitaria, candidiasis y distrofia ectodérmica (*APECED*, autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy), autosómica recesiva, y la poliendocrinopatía de tipo II, autosómica dominante en su forma familiar, algo más frecuente que la tipo I, se asocia a varias endocrinopatías (enfermedad de Addison, diabetes tipo I, hipotiroidismo, IOP) y enfermedades autoinmunitarias (enfermedad de Biermer, vitíligo, etc.). La prevalencia de la insuficiencia ovárica en la poliendocrinopatía de tipo II se calcula en el 10% y los genes implicados en esta afección aún no han sido identificados.

Los antígenos diana del ovario, implicados en la autoinmunidad, son mal conocidos. Algunos anticuerpos son considerados marcadores serológicos de la IOP, como el anticuerpo de célula esteroidea (SCA). Sin embargo, estos anticuerpos sólo se han identificado en las pacientes afectadas por un síndrome APECED. Se han investigado las dianas antigénicas de SCA y se han identificado dos autoantígenos en las gónadas. Son enzimas del *citocromo P450* (*CYP*) implicadas en la síntesis de los esteroides. Al SCA están asociados los anticuerpos anti-17 $\alpha$ -hidroxilasa (*CYP17A*) y anti-20-22 desmolasa (*CYP11AA*). Algunos autores han aislado autoanticuerpos dirigidos contra la enzima P450-scc y contra una proteína de 51 kDa presente en las células de la granulosa, de función desconocida. Otra diana antigénica de los anticuerpos SCA, la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD), responsable de la conversión de la pregnenolona en progesterona, se ha detectado de forma significativa en pacientes afectadas por una insuficiencia ovárica prematura (Weetman, 1995). En un estudio más reciente, se ha demostrado que pocas pacientes que sufren una insuficiencia ovárica tienen anticuerpos anti-3 $\beta$ HSD positivos (uno de 48 casos); estos anticuerpos se encuentran en pacientes con APECED (tres de 15 casos). En el suero de pacientes afectadas por una IOP también se detectaron anticuerpos antizona pelúcida (Koyama et al., 2005; Mande et al., 2011).



La detección de la presencia de los anticuerpos antiovarios puede hacerse con técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Hoy se dispone de las técnicas de análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para detectar los anticuerpos antiováricos séricos. Sin embargo, el papel fisiopatológico de estos anticuerpos es todavía desconocido. Por analogía con los anticuerpos dirigidos contra el receptor de la tirotropina (TSH), los anticuerpos bloqueantes del ligamiento de las gonadotropinas con sus receptores ováricos podrían ser responsables de insuficiencia ovárica. Así, en el suero de dos pacientes con insuficiencia ovárica y miastenia se encontraron inmunoglobulinas que inhiben la unión de la FSH con su receptor (Wemeau et al., 2013).

Es difícil demostrar el origen autoinmunitario de una insuficiencia ovárica, salvo en un contexto familiar autoinmunitario o de asociación con otra enfermedad autoinmunitaria, sobre todo el hipotiroidismo o la insuficiencia suprarrenal. En la práctica diaria, la búsqueda de anticuerpos antiovarios no es útil desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico.

El síndrome *BPES* formado por blefarofimosis, ptosis y epicanto inverso (BPES: blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome) es una enfermedad genética rara, autosómica dominante, que asocia un síndrome malformativo y una insuficiencia ovárica. En el BPES 1, la insuficiencia ovárica se presenta de manera intermitente y con un cuadro clínico de «resistencia ovárica a las gonadotropinas». Los estudios de la segregación familiar de este síndrome permitieron clonar el gen que probablemente cause la enfermedad: el gen *FOXL2*. Se localiza en el cromosoma 3q23 y codifica una proteína que es un factor de transcripción (Dipietromaria et al., 2009).

La proteína **GDF-9** forma parte de la familia del TGF $\beta$  y está implicada en las comunicaciones entre el ovocito y el folículo. La GDF-9 es secretada por los ovocitos. Los ratones invalidados para estos genes presentan una infertilidad por bloqueo de la foliculogénesis en un estadio muy precoz. Las células de la granulosa no se multiplican; los ovocitos, tras una fase de crecimiento rápido, son destruidos; los marcadores de las células de la teca están ausentes. Varios casos de variantes de GDF9 acaban de ser descritos en la especie humana a partir de mujeres con amenorrea primaria o secundaria. Sin embargo, no es posible afirmar si estas variantes son polimorfismos o mutaciones, ya que el estudio funcional es difícil de llevar a cabo (Qin et al., 2015)

En lo referente a la **aceleración de la apoptosis** como responsable de IOP, el mecanismo puede ser de origen tóxico o genético como enseguida expondremos.



Una de las causas más frecuentes de atresia folicular acelerada es la **quimioterapia**. Las sustancias más tóxicas para los ovocitos son los *agentes alquilantes* como las mostazas nitrogenadas, la ciclofosfamida, el clorambucilo y el busulfán (Tabla 3). Cuanto más avanzada es la edad de la paciente en el momento del tratamiento, mayor es el riesgo de que aparezca una insuficiencia ovárica. Así, las pacientes de 40 años tienen amenorrea tras una dosis total acumulada de 5,2 g de ciclofosfamida. Las pacientes más jóvenes toleran una dosis más alta, de 9,5 g, antes de presentar amenorrea. En un grupo de mujeres afectadas por la enfermedad de Hodgkin entre la adolescencia y los 40 años de edad, la amenorrea fue definitiva en el 12-46% de las pacientes tratadas con la asociación de mostaza nitrogenada, vincristina y procarbazona. En el ratón se estudiaron los efectos de la doxorubicina con el propósito de comprender los mecanismos de la toxicidad ovárica de la quimioterapia. Este agente produce *in vitro* una apoptosis en el estadio haploide de las células germinales. Los ratones invalidados para el *gen Bax*, promotor de la apoptosis, tienen folículos primordiales insensibles a la doxorubicina, a diferencia de la cepa salvaje. Las otras sustancias usadas en quimioterapia ejercen probablemente su toxicidad ovárica por la misma vía, es decir, por aceleración de la apoptosis. Sin embargo, este mecanismo sólo fue demostrado para la doxorubicina. Además, los ovocitos pretratados *in vitro* con un inhibidor específico de las *caspasas*, agentes efectores de la apoptosis, se vuelven insensibles al efecto tóxico de la quimioterapia. Estos datos demuestran con claridad que el efecto tóxico de la quimioterapia es la consecuencia de la activación de las vías de señalización de la apoptosis. Estos descubrimientos abren un nuevo horizonte en la prevención de los efectos adversos de la quimioterapia. El *cetrorelix* podría reducir la apoptosis en células de la granulosa a través de la inhibición de la apoptosis mitocondria-dependiente provocada por la quimioterapia (Matikainen et al., 2001; Zhao et al., 2010).

La toxicidad ovárica de la radioterapia podría producirse por un mecanismo similar. La insuficiencia ovárica observada tras radioterapia guarda relación con la dosis, los campos de irradiación y la edad de la paciente en el momento del tratamiento. Los pequeños folículos primordiales son los más sensibles a la toxicidad de la radioterapia. En las mujeres de más de 40 años, la insuficiencia ovárica es casi constante a una dosis fraccionada de 400-700 cGy sobre los ovarios. La repercusión de exposiciones menores es variable: parece que las adolescentes expuestas a dosis fraccionadas de hasta 1.000 cGy, en las que el ovario está en el límite del campo de exposición, sólo sufren insuficiencia ovárica en el 23% de los casos (Christin-Maitre et al., 2002).

**Tabla 3.** Principales productos usados en quimioterapia y su toxicidad respectiva

Toxicidad ovárica	Productos	Mecanismos de acción
Toxicidad segura	Mostaza nitrogenada	Agente alquilante
	Clorambucilo	Agente alquilante
	Ciclofosfamida	Agente alquilante
	Busulfán	Agente alquilante
	Procarbazina	Hidrazina sustituida
Toxicidad probable	Doxorubicina	Antraciclina
	Vinblastina	Alcaloide de la vincapervinca
	Citosina arabinósido	Antimetabolito
	Cisplatino	Agente alquilante
	Carmustina	Agente alquilante
	Lomustina	Agente alquilante
	VP-16	Podofilotoxina
Sin toxicidad	Metotrexato	Antimetabolito
	Fluorouracilo (5-FU)	Antimetabolito
	6-mercaptopurina	Antimetabolito
	Vincristina	Alcaloide de la vincapervinca

En mujeres en período de actividad genital tratadas por cáncer tiroideo se han observado insuficiencias ováricas transitorias de hasta tres ciclos después de la administración de yodo radiactivo. El intervalo está a favor de una toxicidad que alcanza los folículos en fase de reclutamiento. El único efecto perjudicial del tratamiento con yodo radiactivo por neoplasia tiroidea sobre la fertilidad es el aumento del número de abortos cuando se administra en el año que precede a la concepción (Vini et al., 2002).

Algunos factores tóxicos medioambientales pueden favorecer el desarrollo de una IOP. Así, la exposición humana a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, en especial al tabaco, induce un adelantamiento de 2 años de la edad de la menopausia. En ratones tratados con hidrocarburos aromáticos policíclicos se produce una insuficiencia ovárica por destrucción ovocitaria. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos activan un receptor denominado Ahr, que pertenece a la familia de los factores de transcripción. La exposición de ratones hembra a los hidrocarburos aromáticos policíclicos induce la expresión del gen proapoptótico Bax en los ovocitos, cuya consecuencia es un aumento de la apoptosis folicular (Anderson, Nisenblat, & Norman, 2010). En estudios experimentales con animales, estas lesiones ováricas se previenen en los ratones hembras expuestos a los hidrocarburos mediante la inactivación del gen Bax o del gen del receptor de los hidrocarburos Ahr. La unión de los hidrocarburos aromáticos policíclicos al receptor Ahr induce la activación del gen Bax. Por consiguiente, los tóxicos ambientales, en especial el tabaco, podrían ser

responsables de insuficiencia ovárica por aceleración de la apoptosis (Grgoraszczuk et al., 2013).

La galactosemia es una enfermedad rara, autosómica recesiva y secundaria a la mutación del gen de la galactosa-1-fosfatasa uridiltransferasa (GALT). Este gen se localiza en el cromosoma 9p13. El déficit enzimático de GALT causa una acumulación intracelular de la galactosa y sus metabolitos en distintos tejidos. La instauración precoz de un régimen alimentario permite disminuir las anomalías hepáticas, renales y neurológicas, pero no la lesión ovárica. Debido al compromiso plurivisceral desde la infancia, esta afección suele ser detectada precozmente por los pediatras. Más del 65% de las mujeres afectadas por esta enfermedad presenta una amenorrea primaria o secundaria antes de los 30 años de edad. El riesgo de insuficiencia ovárica en la galactosemia es más elevado en las mujeres que tienen menor actividad enzimática. Se señala que la función gonadal en varones con galactosemia es normal. El mecanismo de la lesión ovárica en la galactosemia se desconoce, pero es probable que la acumulación de galactosa en el ovario aumente la atresia folicular (Rubio-Gozalbo et al., 2010).

El síndrome de Perrault constituye otro ejemplo de alteración genética asociada a IOP. Es un síndrome raro que asocia una IOP con sordera de percepción. Las manifestaciones clínicas son muy variables. Se han descrito también retraso de crecimiento y anomalías neurológicas (retraso mental, ataxia generalizada, dismetría, neuropatía, etc.). La transmisión de la enfermedad es autosómica recesiva. Tras descubrir el gen HARS2, el LARS2 es el segundo gen aislado, codificante de ARNt sintetasa mitocondrial, que explicarían las mutaciones que conducen a la sordera y a la IOP en este síndrome, lo cual apoya el papel crítico que juega la mitocondria en el mantenimiento de la función ovárica y la audición (Pierce et al., 2013).

Entre las anomalías del cromosoma X se encuentra el síndrome de Turner, que afecta a 1 de cada 2.500 niñas (en Francia se producen alrededor de 150 nacimientos al año). Entre las manifestaciones clínicas, de gravedad variable, destacan la talla baja, IOP (desde amenorrea primaria con impuberismo hasta la aparición más o menos precoz de una amenorrea secundaria), síndrome dismórfico característico (“pterigium colli”, cúbito valgo, etc.), malformaciones cardíacas, renales, alteraciones sensoriales, diabetes, hipotiroidismo, etc. Alrededor del 30% de las pacientes presenta una pubertad espontánea, pero sólo el 10% tiene ciclos espontáneos. La mayoría tiene una amenorrea primaria y los embarazos espontáneos son excepcionales. Los ovarios están reducidos a simples bandas fibrosas. El

número de ovocitos es normal hasta las 20-24 semanas de vida fetal, tras lo cual se produce rápidamente una atresia de las células germinales. La hipótesis actual para explicar esta atresia acelerada es el efecto de dosis génica. Los dos cromosomas X son activos en los ovocitos a lo largo de la ovogénesis. Si en uno de los cromosomas falta uno o más de los genes necesarios para la viabilidad del ovocito durante la meiosis, puede suceder una atresia acelerada por haploinsuficiencia (Crodts et al., 2011).

La IOP puede ser secundaria a la falta completa de uno de los cromosomas X (es el caso del síndrome de Turner) o a anomalías cualitativas de este cromosoma. Al contrario, también se describieron casos de IOP en pacientes 47XXX. Las anomalías del brazo corto del cromosoma X son responsables de fenotipo semejante al del síndrome de Turner, con estatura reducida y disgenesia ovárica. El fenotipo puede variar según la magnitud de la delección. Las anomalías del brazo largo del cromosoma X, como la delección Xq21-Xq27, suelen ser responsables de una insuficiencia ovárica aislada. El grado de gravedad de la insuficiencia ovárica, en el caso de las deleciones de las porciones terminales del brazo largo del cromosoma X, parece ser proporcional a la dimensión de la delección (Tartaglia et al., 2010).

En las deleciones intersticiales, la función gonadal está moderadamente alterada y se manifiesta por una IOP precedida de ciclos irregulares. En mujeres afectadas por una insuficiencia ovárica se han visto 11 translocaciones distintas entre el cromosoma X y los. La región Xq13q26 tiene un papel fundamental en el funcionamiento del ovario. La considerable anchura de esta región hace que sea poco probable la hipótesis de un gen único en la génesis de la insuficiencia ovárica. Los distintos genes implicados no son conocidos (Cordts et al., 2011).

El gen DIA se ha señalado como gen candidato tras describirse un punto de ruptura en Xq21 en el gen DIA en una familia con insuficiencia ovárica. El gen se identificó por homología con el gen DIA de la *Drosophila* (*Drosophila melanogaster diaphanous*). Las mutaciones del gen DIA afectan la ovogénesis y producen esterilidad en la mosca. El análisis de un gran número de pacientes no ha confirmado la implicación de DIA en la mayoría de los casos de IOP (Dixit et al., 2010). Otro gen candidato podría ser el XPNPEP2, en el que se han descrito nueve translocaciones con puntos de ruptura (Banu et al., 2015; Prueitt et al., 2002).

EL Gen FMR1 (fragile mental retardation), localizado en Xq27.3, es un gen candidato. El síndrome del X frágil o X-FRA, vinculado a la mutación del

gen FMR1, representa la causa más frecuente de retraso mental hereditario masculino (1 de cada 1.000-1.500 casos). El gen mutado es portador de una repetición anómala de tripletes CGG en la porción proximal del gen. En la persona afectada, el número de tripletes es superior a 200. En la persona con premutación y, por tanto, asintomática pero transmisora de la enfermedad, el número de tripletes está comprendido entre 60-200. En la persona sana, el número de tripletes es inferior a 60. Se ha demostrado una asociación entre la premutación X-FRA y la IOP, en particular para su forma familiar. El mecanismo de esta asociación se desconoce. En una serie de casi 400 pacientes portadoras de la premutación, en el 16% la menopausia tuvo lugar antes de los 40 años de edad. Además, si la premutación se busca de forma sistemática en las pacientes afectadas por una IOP, se encuentra en alrededor del 3% de los casos de insuficiencia ovárica esporádica y en alrededor del 12% de los casos de insuficiencia familiar. Las pacientes portadoras de la premutación, que conservan ciclos regulares, tienen un nivel de FSH más alto (indicio de una disfunción ovárica) que las controles (Tural et al., 2015).

El Gen BMP15 o GDF-9B, también se ha propuesto como candidato para desarrollar IOP cuando se altera, sin embargo aún no está claro si se trata de una verdadera mutación o un polimorfismo (Greene et al., 2014).

Genes implicados en el proceso de meiosis se han estudiado recientemente en pacientes afectadas por IOP: cDNA (DMC1), MutS homolog (MSH4), MSH5 y *S. cerevisiae* homolog (SPO11); el estudio demostró que las mutaciones de DMC1 y MSH5 podrían ser responsables de la IOP (Greene et al., 2014).

El mecanismo de disminución de la reserva de los folículos primordiales se ha estudiado con los genes del ligando de kit y su receptor c-kit. En los ratones en los que el gen c-kit está mutado, el número de células germinales y de folículos primordiales está disminuido. La mutación que afecta la función de c-kit en el ser humano no causaría infertilidad femenina. La invalidación del gen de ligando de kit en el ratón produce una detención del crecimiento folicular en el estadio de folículo primario. Hasta ahora no se ha identificado un equivalente en la especie humana (Hasegawa et al., 2009).

La conexina 37 está presente en las uniones gap entre el ovocito y las células de la granulosa de los folículos secundarios. Los ratones invalidados (“knock out”) para el gen de la conexina 37 presentan infertilidad por bloqueo de la foliculogénesis en el estadio de folículo secundario. Los ovocitos no alcanzan el tamaño normal y no pueden continuar con la meiosis. En los ovarios de estos ratones se observan folículos hasta el estadio

secundario, pero pocos folículos antrales, ningún folículo preovulatorio (falta de ovulación) y el desarrollo de numerosos cuerpos lúteos. Sin embargo, en la mujer no se ha descrito una mutación de este gen (Denomme et al., 2012).

En la aceleración de la apoptosis se han estudiado los genes Bax y Bcl-2 (pro y antiapoptóticos) y se ha observado que los ratones invalidados para Bcl-2 tienen un menor número de folículos primordiales pero son fértiles; los invalidados para el gen Bax mantienen sus reservas foliculares y los ovarios de éstos últimos contienen un gran número de folículos primordiales y la apoptosis de las células de la granulosa es menor (Takai et al., 2003).

Un gen candidato situado en el brazo corto del cromosoma X es ZFX, cuyo homólogo murino es el gen Zfx. Los ratones invalidados para el gen Zfx tienen una vida reproductiva más corta. El estudio histológico de los ovarios revela una reducción del número de células germinales. En mujeres afectadas por IOP no se ha detectado ninguna mutación del gen ZFX (Simpson et al., 1999).

Recientemente se ha descubierto que el gen Wnt4, implicado en mantener la polaridad celular, podría participar en la IOP mediante aceleración de la apoptosis (Prunskate-Hyyrylainen et al., 2014).

En lo referente al diagnóstico clínico de IOP, la aparición de amenorrea es constante. Raras veces se trata de una amenorrea primaria, que puede acompañarse de impuberismo y retraso de crecimiento. La principal causa de amenorrea primaria identificada es el síndrome de Turner o sus variantes.

En la mayoría de los casos, se trata de una amenorrea secundaria (falta de menstruaciones durante más de 4 meses) que aparece antes de los 40 años.

La manifestación clínica que permite guiar el diagnóstico de una amenorrea hacia una causa extraovárica es la presencia de síntomas vasomotores (bochornos y crisis de sudoración nocturnas).

La carencia de estrógenos es responsable de varios signos clínicos y de complicaciones. El descenso de la concentración de estradiol provoca sequedad vaginal (por disminución de las secreciones vaginales) con posibilidad de dispareunias.

La hipoestrogenemia también repercute sobre el aparato urinario (riesgo de incontinencia urinaria de esfuerzo, infecciones urinarias recidivantes, disuria y urgencia

miccional). La insuficiencia estrogénica favorece la producción de una osteopenia, incluso de una osteoporosis con riesgo de fracturas y, sobre todo, aplastamientos vertebrales. Por último, la carencia estrogénica se acompaña de un aumento del riesgo cardiovascular.

Para el diagnóstico **etiológico** de la IOP, algunas manifestaciones clínicas son orientadoras:

- Casos de retrasos mentales en los varones de la familia, sobre todo si en ésta hay varios casos de IOP, deben hacer presumir una premutación del X frágil.
- Una baja estatura, más o menos asociada a un síndrome dismórfico, orienta hacia un síndrome de Turner o una disgenesia gonadal.
- El diagnóstico de galactosemia se establece a menudo en pediatría ante una insuficiencia hepática o una insuficiencia renal.
- Un síndrome malformativo oftálmico (blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso) con cirugías palpebrales en la infancia, en un contexto familiar, hace presumir un BPES.
- La asociación entre ataxia cerebelosa, telangiectasias y déficit inmunitario es típica de una enfermedad genética rara: la ataxia-telangiectasia.
- Una hipoacusia de percepción debe hacer pensar en un síndrome de Perrault.
- Una hipertensión arterial con hipopotasemia sugiere la presencia de un déficit enzimático de 17 $\alpha$ -hidroxilasa o 17-20 desmolasa.
- La presencia de una insuficiencia suprarrenal puede indicar una mutación del gen StAR en casos excepcionales, pero sobre todo una causa autoinmunitaria. Así mismo, la presencia de cualquier alteración autoinmunitaria endocrina o no endocrina es indicio de una insuficiencia ovárica de origen autoinmunitario, sea ésta aislada o se integre en el contexto más infrecuente de las poliendocrinopatías autoinmunitarias. La asociación más frecuente es el hipotiroidismo.

Una anamnesis detallada es esencial. Permite precisar los antecedentes personales (quimioterapia, radioterapia, cirugía pélvica, consumo de tabaco, enfermedades autoinmunitarias, historia clínica de los ciclos, etc.) y familiares (edad de la menopausia de las mujeres de la familia, afecciones autoinmunitarias familiares, trastornos puberales y de la



diferenciación sexual o infertilidad en la familia, antecedentes de retrasos mentales en los varones, etc.)

En la exploración física se busca un retraso de crecimiento, una anomalía del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios o un síndrome dismórfico de tipo Turner en caso de amenorrea primaria. La exploración ginecológica sirve para apreciar la troficidad vaginal. Hay que buscar manifestaciones endocrinas: hipotensión, melanodermia (insuficiencia suprarrenal), estreñimiento, intolerancia al frío, bocio (hipotiroidismo) (Falorni et al., 2012).

Las determinaciones de FSH, LH y estradiol se repiten al menos dos veces con 1 mes de intervalo. Al respecto, la IOP avanza por oleadas en alrededor del 50% de los casos. Períodos de recuperación de la función ovárica alternan con períodos de insuficiencia ovárica. El diagnóstico se establece por la presencia de una amenorrea de al menos 4 meses, con dos determinaciones de FSH por encima de 40 mUI/ml, practicadas con un intervalo de 1 mes en una paciente menor de 40 años (Tabla 4). La LH se eleva, pero el aumento de la FSH siempre es claramente superior al de la LH, al igual que en la menopausia fisiológica. Así mismo, la estradiolema descende en concentraciones variables, por lo general inferiores a 50 ng/ml (Mendoza et al., 2015).

**Tabla 4.** Valoración de una insuficiencia ovárica prematura

<b>Diagnóstico positivo</b>	FSH superior a 40 en dos determinaciones con 1 mes de intervalo
<b>Diagnóstico etiológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cariotipo</li> <li>- Ecografía pélvica</li> <li>- TSHus</li> <li>- Anticuerpos antitiroperoxidasa y antitiroglobulina</li> <li>- Glucemia en ayunas</li> <li>- ± prueba de la ACTH</li> </ul>
<b>Control</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Densitometría ósea</li> <li>- Colesterol total, triglicéridos</li> </ul>

FSH: hormona foliculoestimulante; TSHus: hormona estimulante del tiroides ultrasensible.

Para la exploración de la insuficiencia ovárica es indispensable el estudio genético. Consiste en la práctica de un cariotipo para detectar la ausencia del cromosoma X, un mosaico, una delección, una translocación del cromosoma X o bien la presencia de material Y. Hay que buscar sistemáticamente una premutación del gen FMR1 en los casos



familiares de IOP y, sobre todo, frente a antecedentes de retraso mental en los varones de la familia.

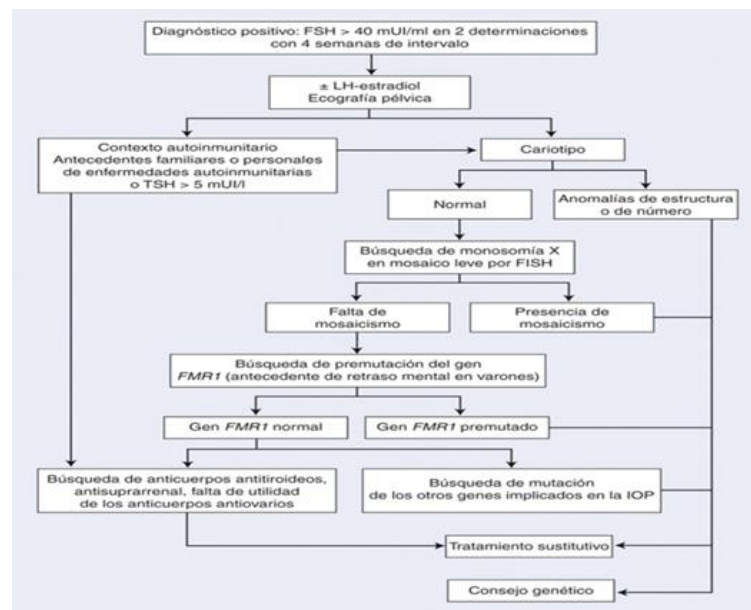
La ecografía pélvica permite identificar uno o ambos ovarios, su tamaño, la presencia de folículos y el tamaño del útero. Con frecuencia se constata un desarrollo folicular, que se observa en alrededor del 40% de las pacientes con amenorrea secundaria y gonadotropinas elevadas. Incluso puede haber signos de luteinización. Sin embargo, aunque la presencia de folículos ováricos influye en la búsqueda etiológica, no modifica la conducta terapéutica.

La biopsia ovárica no produce ningún beneficio clínico porque no permite hacer un pronóstico sobre la función ovárica residual. Tampoco presta utilidad la búsqueda de anticuerpos antiovarios en el suero de las pacientes. Éstos son inespecíficos, carecen de valor diagnóstico para una autoinmunidad, no tienen valor pronóstico y su presencia no modifica la conducta terapéutica (Kalu et al., 2008).

En un contexto autoinmunitario es importante descartar un hipotiroidismo mediante la determinación de TSH ultrasensible, ya que el hipotiroidismo representa la enfermedad autoinmunitaria que con más frecuencia acompaña a la insuficiencia ovárica. También resulta conveniente investigar posibles signos de autoinmunidad tiroidea mediante la determinación de los anticuerpos antitiroperoxidasa y antitiroglobulina. Para diagnosticar una diabetes mellitus insulín dependiente debe medirse la glucemia en ayunas. La mayoría de las veces, la insuficiencia suprarrenal precede a la insuficiencia ovárica, por lo que se debe buscar clínicamente o mediante la determinación del cortisol plasmático a las 8 de la mañana y 1 hora después de la inyección de ACTH (250 µg) en caso de sospecha diagnóstica.

Por último, una densitometría ósea en el momento del diagnóstico y luego de forma regular cada 2 o 3 años, es útil para verificar la eficacia del tratamiento sustitutivo sobre la mineralización ósea.

El uso de un árbol de decisión se sugiere para el tratamiento de las pacientes afectadas por una IOP (Fig. 5).



**Figura 5.** Árbol de decisiones. Conducta médica ante la insuficiencia ovárica prematura (IOP).  
FISH: hibridación fluorescente in situ; LH: hormona luteinizante; TSH: tirotropina;  
FSH: hormona foliculoestimulante.

## ▪ Disfunción ovulatoria

En este apartado se incluyen los trastornos relacionados con la ovulación periódica, destacando el SOP.

**a) Síndrome de ovarios poliquísticos (SOP).** Se trata de la forma más frecuente de anovulación crónica hiperandrogénica.

- Diagnóstico (Criterios de Rotterdam, 2003). Al menos 2 de los 4:
  - Oligo y/o anovulación.
  - Signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo.
  - Ovarios poliquísticos (Fig. 5) y exclusión de otras etiologías (hiperplasia suprarrenal, tumores productores de andrógenos, Síndrome de Cushing).
  - Presencia de 12 o más folículos de 2-9 mm de diámetro en cada ováριο y/o aumento del volumen ovárico >10 mL (0.5 x longitud x anchura x grosor).
- Prevalencia y epidemiología:
  - 20% de población general con ovarios de apariencia poliquística (OAP). El 50% de ellos con criterios de SOP.
  - Diferencias raciales.
  - Agrupación familiar.

- 105 millones de mujeres en todo el mundo (5-10%).
- 23% desarrollan síndrome metabólico a largo plazo.
- Manifestaciones clínicas (Origen puberal, desarrollo crónico y progresivo):
  - Opsomenorrea (36-90 días).
  - Amenorrea (> 90 días).
  - Acné.
  - Hirsutismo (Ferriman-Gallwey >8).
  - Obesidad.
  - Acantosis nigricans.
  - Esterilidad.
  - Desarrollo muscular aumentado.



**Figura 5.** Aspecto macroscópico de ovario SOP.

- Consecuencias a largo plazo:
  - *Consecuencias metabólicas y endocrinas:*
    - ✓ *Diabetes II.* El SOP es un factor de riesgo independiente de DMII. En todas las pacientes con SOP, sobre todo las obesas, debe realizarse una determinación de la glucosa basal y la glucosuria, con periodicidad anual. Ante un resultado anormal debe realizarse una prueba de tolerancia a glucosa. Estas pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una diabetes tipo II en base a una insulinresistencia.
    - ✓ *Enfermedad cardiovascular.* Los factores de riesgo en mujeres con SOP están aumentados a una edad más temprana que en mujeres sin SOP. Los riesgos para desarrollar arteriosclerosis, hipertensión e IAM son mayores. No se ha demostrado una

mortalidad mayor por enfermedad cardiovascular en estas pacientes. La determinación de colesterol, lípidos y triglicéridos debe ser considerada en estas pacientes, ya que la detección precoz de niveles anormales puede mejorar con dieta y ejercicio.

✓ *Síndrome metabólico.* Se produce con mayor frecuencia en el SOP.

✓ *Cáncer ginecológico:*

\* *Endometrio.* Es debido a la anovulación crónica y al estímulo acíclico de los estrógenos. La evidencia epidemiológica es limitada. Esta asociación sólo se presenta en mujeres premenopáusicas. Pronóstico de cáncer de endometrio en mujeres con SOP similar al de otras pacientes.

\* *Mama.* Antecedentes familiares de cáncer de mama es significativamente mayor en SOP.

- Consecuencias sobre la gestación:

- *Diabetes gestacional:* en mujeres con SOP gestantes debe realizarse O'Sullivan desde el primer trimestre de embarazo. A las mujeres que han sido diagnosticadas de SOP antes del embarazo, sobre todo, las que han necesitado inducción de ovulación para gestar, se les debe hacer despistaje de diabetes gestacional al inicio del embarazo.

- *HTA/pre-eclampsia.*

- *Aborto:* el hiperinsulinismo se asocia a mayor incidencia de aborto espontáneo en pacientes con anovulación crónica hiperandrogénica que gestan tras técnicas de reproducción asistida. Se debe normalizar el peso y los niveles de insulina con medidas dietéticas y/o farmacológicas podría mejorar los resultados reproductivos en estas mujeres.

- Alteraciones del sueño. Existe una mayor frecuencia de apnea obstructiva.

- *Medidas terapéuticas:* deben ir orientadas a corregir el IMC cuando sea necesario; también el perfil glucémico si está alterado hay que corregirlo; la metformina y el mioinositol mejoran el patrón ovulador; el “*dilling ovárico*” sólo se reserva para casos resistentes a la inducción de la ovulación si la paciente tiene deseos genésicos, ya que su efectividad suele ser transitoria (6 meses); el citrato de clomifeno es el tratamiento de entrada más utilizado para inducir la ovulación y si fracasa se deberán utilizar gonadotropinas sin acción LH.

Las evidencias actuales expresadas anteriormente sobre el SOP han sido consultadas en la última guía de diagnóstico y tratamiento del SOP (Orio et al., 2014).

**b) Anovulación.** Se manifiesta por amenorrea y las causas más frecuentes son:

- **Disgenesias gonadales.** Entre éstas destacan el *síndrome de Turner* y el *síndrome de Swyer* o disgenesia gonadal pura.
- **Amenorrea hipofisarias.** En este grupo se incluyen tumores hipofisarios, síndrome de silla turca vacía y alteraciones funcionales, entre los que destaca el *síndrome de Sheehan*.
- **Amenorreas hipotalámicas.** Amenorreas psicógenas, por desnutrición, obesidad, ejercicio físico intenso, defectos genéticos y *síndrome de Kallman*.
- **Amenorreas tiroideas y suprarrenales.** Disfunciones glandulares tiroidea y suprarrenal pueden producir anovulación.

#### **E. Factor uterino**

Malformaciones, sinequias, pólipos y miomas. Existen controversias en su relación con la esterilidad. Se relacionan más con abortos y trataremos el tema en el siguiente apartado.

#### **F. Factor cervical**

En el cérvix pueden existir alteraciones tanto anatómicas, como funcionales y iatrogénicas. Las alteraciones a este nivel se suelen soslayar al indicar la TRA oportuna por lo que no entraremos a desarrollar este punto al no formar parte de nuestro objetivo.

#### **1.2.2. Factor masculino**

Supone un 30-35% de las indicaciones de FIV/ICSI (Registro SEF, 2013).

Las causas se clasifican en:

- Pre-testicular: eje H-H-O alterado (poco frecuente)
- Testicular: genéticas, congénitas, adquiridas...
- Post-testicular: obstructivas, infecciosas, inmunológicas, alteración eyaculatoria y alteración coital.

### 1.2.3. Factor mixto

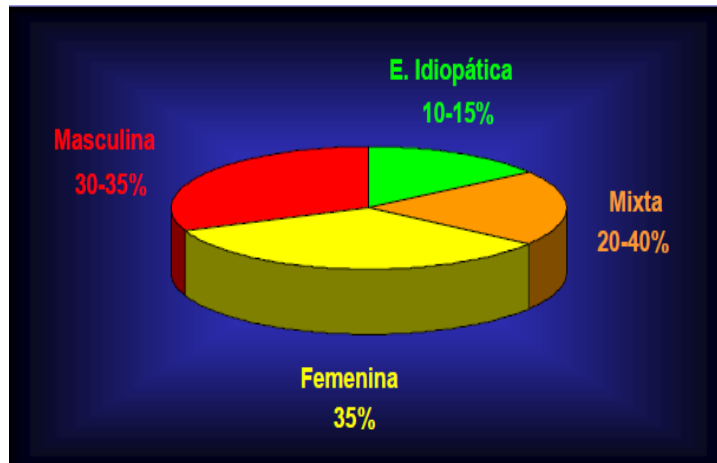
Aquí incluimos la combinación de factor femenino y masculino. Suponen un 20-40% de las indicaciones según qué fuente se consultada.

### 1.2.4. Esterilidad de origen desconocido (EOD)

- **Definición, diagnóstico y epidemiología**

La EOD se define como la imposibilidad de lograr una gestación después de un año de relaciones sexuales sin protección, con un estudio rutinario que no muestra anormalidades (Randolph, 2000). Según las sociedades científicas el tiempo varía, así para la ASRM, SEGO y SEF se establece un periodo de 12 meses sin concebir, y para la ESHRE, FIGO y OMS 24 meses. La EOD representa el 10-18% del total según la fuente consultada (Fig. 6), (Tabla 5) (Registro SEF, 2013).

Diagnóstico por exclusión: pareja con todas las investigaciones clínicas habituales (contrastadas por MBE) que presentan unos resultados normales.



**Figura 6.** Prevalencia del origen de la esterilidad (Registro SEF, 2013).

**Tabla 5.** Indicaciones de FIV/ICSI (Registro SEF 2013)

<b>Indicaciones de FIV/ICSI</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Factor femenino	9.586	30,3
Factor masculino	7.719	24,4
Causas mixtas	8.177	25,8
E.O.D.	5.174	16,4
Parejas serodiscordantes	181	0,6
Mujer sin pareja masculina	801	2,5
Total indicaciones	31.638	100

La prevalencia de la disfunción reproductiva es el porcentaje de mujeres de una población que no logran una gestación en un periodo de tiempo determinado. Se realizó un seguimiento de una población de 96 parejas infértiles no tratadas durante 7 años, de las cuales, a los 3 años el 25% obtuvo un hijo, de las restantes ninguna volvió a concebir en el plazo de los 4 años siguientes; pero, de las que consiguieron el embarazo, el 30% era EOD, el 6% endometriosis grados III y IV y el 0% factor masculino severo (Collins et al., 1995). En consecuencia, no todas las causas de subfertilidad tienen la misma relevancia en cuanto al pronóstico.

La tasa de fecundabilidad en la EOD es baja, no superando el 1.3%, lográndose el 60% de gestaciones espontáneas en los 3 siguientes años al diagnóstico; pero esta baja tasa de fecundabilidad es ¿porque en la mayoría de las EOD la mujer es mayor de 30 años? o porque verdaderamente hay defectos latentes o indetectables que alteran las condiciones normales para la gestación como, por ejemplo, la endometriosis leve.

- **Propuestas etiológicas para la EOD**

Se han atribuido numerosas alteraciones subclínicas y ninguna ha sido demostrada con suficiente evidencia científica ni su tratamiento se ha relacionado con una mayor tasa de fertilidad posterior.

- Factores ováricos-endocrinos: 1.- Crecimiento folicular anómalo. 2.- Síndrome del Folículo luteinizado no roto (LUF). 3.- Hipersecreción de LH. 4.- Hipersecreción de

prolactina en presencia de ovulación. 5.- Reducción de la secreción/sensibilidad a los factores hormonales de crecimiento. 6.- Anomalías morfológicas en los ovocitos. 7.- Anomalías genéticas en los ovocitos. 8.- Anticuerpos en la zona pelúcida.

- Factores peritoneales: 1.- Alteración en la inmunidad con incremento de actividad de los macrófagos. 2.- Endometriosis leve. 3.- Anticuerpos antichlamydia.

- Factores tubáricos: 1.- Alteración en la funcionalidad ciliar o en la peristalsis. 2.- Alteración de la inmunidad con incremento en la actividad de los macrófagos.

- Factores endometriales 1.- Secreción anormal de proteínas endometriales. 2.- Alteración molecular de la adhesión mediada por integrinas. 3.- Alteración en la actividad de los linfocitos T y células Natural Killers. 4.- Factores de secreción embriotóxicos. 5.- Alteraciones de la perfusión uterina.

- Factores cervicales: 1.- Alteración del moco cervical. 2.- Incremento en la actividad inmunológica celular.

- Factores masculinos: 1.- Reducción de la motilidad, reacción acrosómica, “binding” al ovocito y penetración en la zona pelúcida. 2.- Alteraciones ultraestructurales en la cabeza de los espermatozoides por oxidación. 3.- Anticuerpos antiespermáticos.

- Factores embriológicos: 1.- Mala calidad embrionaria. 2.- División embrionaria lenta. 3.- Progresión in vitro reducida hasta estadio de blastocisto. 4.- Alteraciones cromosómicas o génicas que incrementan la tasa de aborto muy precoz.

- **Principales hipótesis etiológicas en la EOD**

1.- Defectos de fase lútea 2.- Síndrome del Folículo luteinizado no roto (LUF) 3.- Alteraciones en el moco cervical 4.- Anticuerpos antiespermáticos 5.- Lesiones espermáticas por oxidación 6.- Factores emocionales 7.- Infecciones subclínicas por Chlamydia trachomatis 8.- Perfiles inmunológicos alterados 9.- Anomalías genéticas ovocitarias y embrionarias 10.- Perfil de expresión génica alterado en endometrio 11.- Otras patologías intercurrentes.

**1.- Defectos de fase lútea.** La biopsia endometrial se considera actualmente una prueba obsoleta. No se debe indicar una biopsia endometrial como parte del estudio de los defectos de fase lútea porque no hay evidencia de que el tratamiento médico de los defectos de fase lútea mejoren las tasas de embarazo (recomendación grado B). Si existe



sospecha de patología endometrial está indicada la realización de una histeroscopia (Coutifaris et al., 2004; McGovern et al., 2004).

**2.- Síndrome del folículo luteinizado no roto (LUF).** Ausencia de ovulación, aunque se constatan todos los cambios ovulatorios secundarios (pico de LH, aumento de progesterona sérica y transformación secretora del endometrio). No está claro si se trata de una variable biológica o es en realidad un verdadero síndrome. El LUF se ha propuesto como fenómeno recurrente en la EOD, como demuestra un estudio prospectivo en el que existía mayor porcentaje de LUF en EOD que en esterilidad de causa tubárica. Otro estudio muestra mayor incidencia y recurrencia de LUF en ciclos subsecuentes de IA y propone pasar a FIV/ICSI en estos casos (Qublan et al., 2006).

**3.- Alteraciones en el moco cervical.** Descrito como factor etiológico: 5-7% de las causas de esterilidad. Entre las funciones del moco cervical están las de proteger a los espermatozoides del medio hostil de la vagina, suministrar energía a los espermatozoides para su transporte, filtrar espermatozoides anormales, actuar como reservorio espermático, colaborar en la capacitación espermática y dotar de mecanismos inmuno-selectores que eviten la entrada de microorganismos al interior de la cavidad uterina. No se debe indicar estudios del moco cervical o TPC (test postcoital) en la investigación de los problemas de fertilidad porque, independientemente del desacuerdo sobre el momento de realización y la controversia sobre su valoración, carecen de valor predictivo sobre las tasas de gestación (recomendación grado A). Si suponemos que estos estudios tienen algún valor diagnóstico, lo indicado es recurrir a ciclos de inseminación artificial para obviar el factor cervical (Grimes et al., 1995; Oei et al., 1998).

**4.- Anticuerpos antiespermáticos (AAE).** En un estudio se encuentra mayor proporción de AAE (suero o moco cervical) en EOD que en el resto de las etiologías de esterilidad y en otro se encuentra Ac IgA e IgM a elevadas concentraciones en la superficie de los espermatozoides, lo que conduce a una correlación negativa con la posibilidad de gestación espontánea (Abshagen et al., 1998). Otros estudios observan que no existe una causa inmunológica como factor aislado de esterilidad (la EOD no se debe sólo a la presencia de AAE en suero) (Lahteenmaki et al., 1995). Mazundar y Levine (1998) realizan revisión crítica de la literatura entre 1966-1997 y concluyen en que, aunque parece objetivarse cierta sospecha de que los AAE perjudican la fertilidad en las parejas con EOD, la interpretación de las pruebas es demasiado subjetiva y su estudio no mejora las tasas de

gestación. Se ha observado que la técnica del “Ensayo de Hemizona” previa a IA carece de valor predictivo sobre la tasa de embarazo posterior (Arslan et al., 2006).

**5.- Lesiones espermáticas por estrés oxidativo.** Cante (1995) estudia las lesiones oxidativas en los lípidos de la membrana, con importante insulto al espermatozoide, especialmente en relación a su movilidad y reacción acrosómica, como causa de EOD. En realidad, no existen estudios útiles y con rigor científico que avalen que los AAE o los radicales libres sean un factor decisivo en la EOD (Imamovic et al., 2014).

**6.- Factores emocionales.** Existe un efecto producido por la EOD sobre la función psicosexual y viceversa, sin quedar claro dónde se inicia el círculo vicioso y cuál es el alcance de sus consecuencias. La depresión o la historia de depresión son significativamente más elevadas en mujeres con EOD que en un grupo control. La EOD prolongada provoca una “agonía compartida en la pareja”, que a su vez motiva una disfunción sexual. El reconocimiento de una causa que justifique su esterilidad recupera el normal comportamiento sexual (Lamas et al., 2006; Meller et al., 2002).

**7.- Infecciones subclínicas por *Chlamydia trachomatis*.** Se trata de una bacteria Gram negativa, agente infeccioso del aparato genital (mucosa tubárica, endometrial y endocervical), donde puede actuar de forma subclínica y producir lesiones como subfertilidad, embarazo ectópico o endosalpingitis silente no detectable que se comportarían como falsa EOD. Es mejor determinar Ac en suero que realizar cultivos endocervicales o endometriales. La ESHRE recomienda la titulación de Ac antichlamydia como de tercera categoría, mientras que el RCOG la reconoce como de primera categoría y establece que es el mejor cribado inicial para descartar patología tubárica (nivel de evidencia IIb). La desventaja es que no ofrece detalles de la anatomía del útero o trompas, y la ventaja es que títulos de Ac antichlamydia  $>1/256$  se asocian de forma estadísticamente significativa a daño tubárico. Como profilaxis al daño tubárico se indica doxiciclina 100mg/12 horas desde 5 días antes o azitromicina 1 g a dosis única 12 horas antes de cualquier instrumentación uterina (Nivel IIb-III de evidencia. Recomendación B-C). Como conclusión, la titulación de Ac antichlamydia es de primera elección en el estudio de las parejas con EOD (Guvén et al., 2007).

**8.- Perfiles inmunológicos alterados.** Se ha visto que existe un incremento en la prevalencia de Ac anticardiolipina en pacientes con EOD, por lo que los resultados en los ciclos de FIV/ICSI serían peores. No existe una evidencia estadísticamente significativa de que la administración indiscriminada a dosis bajas de AAS (indicado en

SAF) mejore el resultado clínico de estas pacientes cuando son sometidas a TRA (Geva et al., 1995; Poustie et al., 2007).

Se han observado alteraciones en la función inmune de los linfocitos y macrófagos en mujeres con EOD, tanto en sangre como en líquido peritoneal, sin embargo, se ha visto que existe un patrón inmunológico idéntico al de las pacientes con endometriosis, con lo que cabría preguntarse si la endometriosis mínima representa una falsa EOD (Gleicher et al., 1994). Se ha observado un incremento de Ac antiovario humano y ANA (Ac antinucleares) en el suero de pacientes con EOD sometidas a FIV (Haller et al., 2006).

No existe una evidencia estadísticamente significativa de que la administración indiscriminada de glucocorticoides en ciclos TRA mejore el resultado clínico en la EOD (Boomsma et al., 2007).

El valor pronóstico de determinar la concentración de células NK en sangre periférica o en útero permanece incierto y se necesitan más estudios para intentar discriminar qué tipo de pacientes podrían beneficiarse de la inmunoterapia (Tang et al., 2011).

**9.- Anomalías genéticas ovocitarias y embrionarias.** La aneuploidía es un fenómeno muy frecuente en embriones en estadios preimplantatorios (alrededor del 70% de los embriones en FIV) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Aneuploidías y anomalías postmeióticas en embriones preimplantados

Edad	20-34	35-39	40-42
Aneuploidía (9 cr)	24%	27%	39% <sup>a</sup>
Otras aneuploidías (mediante CGH)*	5%	6%	8% <sup>b</sup>
Anomalías post meióticas**	35%	36%	35% <sup>c</sup>
Total anomalías	64%	69%	82% <sup>d</sup>

a,d: p<0.001; b: desc; c: NS

Munné et al, 1995 ; Márquez et al., 2000 ; \*Gutiérrez-Mateo et al., 2004

Se ha observado que existe un incremento estadísticamente significativo de contenido cromosómico anómalo (en número o en estructura) en los ovocitos con fracaso de fecundación después de una FIV en mujeres con EOD, comparado con los ovocitos con fallo de fecundación provenientes de un factor masculino aislado (Plachot et al., 1997).

Otros estudios relacionados con anomalías ovocitarias y embrionarias en la EOD han observado una ZP más gruesa (Loret De Mola et al., 1997) , un incremento de fallos de fecundación en FIV clásica, una menor probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto (Wittermer et al., 1990), y una mayor tasa de bloqueos de división (Tambo et al., 1990).

**10.- Perfil de expresión génica endometrial alterado.** En la era pre-genómica, sólo se podían llevar a cabo estudios "gen a gen" para evaluar la “ventana” de implantación. Hoy se entiende el proceso de implantación embrionaria como un equilibrio de genes expresados y reprimidos, bajo el control de las hormonas esteroideas y de otros factores reguladores locales paracrinos y autocrinos. La tecnología de microarrays ya permite estudiar de forma global la regulación transcripcional de este proceso biológico e intentar indagar sobre expresiones alteradas como en la endometriosis, en el fallo de implantación, en la EOD, etc.

La expresión génica endometrial durante la fase peri-implantatoria en mujeres con EOD es notablemente distinta de la objetivada en las mujeres fértiles. Estos resultados proporcionan una nueva información sobre genes y alteraciones fisiopatológicas que podrían tener importancia en cuanto a la receptividad funcional endometrial y la implantación embrionaria subsecuente en la paciente con EOD (Altmae et al., 2010).

**11.- Otras patologías intercurrentes.** La enfermedad celíaca se relaciona con subfertilidad y abortos de repetición. Son marcadores altamente específicos y sensibles de enfermedad celíaca los Ac anti-endomisio (EMA) - Ac anti-transglutaminasa tisular (tTG) de tipo IgA y Ac antipéptidos deaminados de gliadina (ADG) (Bradley et al., 2004; Shamaly et al., 2004).

- **Estrategia de tratamiento en la EOD**

Tanto el inicio como el tipo de tratamiento van a depender de la duración de la EOD, de la edad de la mujer y de la historia previa de embarazo. Así, a mayor duración, menor probabilidad de embarazo, y si la esterilidad es de más de 3 años, la tasa de gestación decrece un 24% por año. Como es obvio, a menor edad de la mujer, mayor probabilidad de embarazo, dándose los mejores resultados en pacientes con menos de 30 años y menos de 3 años de esterilidad. Si existe antecedente de embarazo, la probabilidad de éxito en la EOD es el doble que en la esterilidad primaria (Collins et al., 1992). Se recomienda conducta expectante durante 6-12 meses si la mujer es menor de 30 años o la duración de la EOD es

menor de 3 años de evolución y, en caso contrario, conducta activa (RCOG guideline, 2004; Collins et al., 1992).

.En *el tratamiento de la EOD* encontramos distintas modalidades en la literatura:

- Meta-análisis (Cohlen et al., 1998): 18 estudios. Concluye que la IIU en ciclo natural no mejora las probabilidades de embarazo en la EOD, pero en los ciclos estimulados, la IIU tiene un efecto positivo independiente, con lo que la propia estimulación de Ovulación (EO) es más importante que la IIU en la EOD.

- Meta-análisis (Zeyneloglu et al., 1998): 7 estudios (980 ciclos). Las tasas de embarazo pasan del 11,37% con EO sola, a un 20,04% con EO + IIU. Concluye que las parejas con EOD se benefician de asociar EO + IIU.

- Meta-análisis (Hughes, 1997): 1<sup>er</sup> análisis de 8 estudios. La EO + IIU objetiva tasas de embarazo superiores frente a EO con FSH y coito dirigido. 2º análisis de 22 estudios (4.516 ciclos). Las tasas de embarazo son 5 veces superiores con EO + IIU.

- Análisis de datos de ASRM (1998): 45 estudios. La IIU aislada no parece tener ningún efecto beneficioso sin alguna forma de EO. La EO con clomifeno tiene menos efectividad que la realizada con gonadotropinas (Gn), tanto en los ciclos con relaciones dirigidas (tasa de gestación 5,6 vs 7,7 % respectivamente), como en los que se asocia a IIU (8,3 vs 17,1 % respectivamente).

Podemos concluir con que la técnica que mejor coste-beneficio tiene es la EO con Gn + IIU, siendo ésta de primera elección.

- Estudio prospectivo observacional (594 parejas con EOD y 1.273 ciclos de EO + IIU). La tasa de embarazo en los 3 primeros ciclos fue del 16,4 %, y en el 4-6º ciclo del 5,6 %. La FIV debe indicarse cuando fallen 3 ciclos de EO + IAI (Aboulghar et al., 2001).

- Actualización en IIU: 20 estudios. Concluye que la EO e IIU son factores positivos independientes (Aboulghar et al., 2003).

- Ensayo clínico multicéntrico europeo en 444 parejas con EOD y 649 ciclos. La estimulación ovárica es mucho más efectiva cuando se asocia a cualquier tipo de tratamiento de reproducción asistida (IIU, GIFT, FIV) (Crosignani et al., 1991).

- Ensayo clínico multicéntrico americano (932 parejas). 231 parejas tratadas con EO+IIU (tasa de embarazo: 33%) vs 234 parejas con IIU sola (tasa de embarazo: 18%). 234 parejas se trataron con EO+IIU (tasa de embarazo: 19%) vs 233 parejas con IIU (tasa de embarazo: 10%). Concluye que tanto la EO como la IIU tienen un efecto positivo por sí solas, sin embargo la máxima eficacia se obtiene cuando ambas se asocian (Guzick et al., 1998).

- Estudio de 258 parejas con EOD y factor masculino (86 IIU sin estimulación, 85 EO+IIU y 87 FIV). La tasa de embarazo por ciclo resultó similar entre la IIU sin estimulación (7,4%) y la IAI con estimulación (8,7%) y ligeramente superior en FIV (12,2 %), aunque sin diferencias significativas. Concluye que la IIU debe ser el tratamiento de 1ª elección, ya que tiene menos riesgos que la EO + IIU y la FIV (Goverde et al., 2000).

- Revisión Cochrane de 4 ensayos clínicos. Concluye que la efectividad de la FIV en la EOD está por demostrarse (Pandian et al., 2005).

- La técnica más recomendable en la EOD cuando fracasa la IIU es la ICSI. El fallo completo de fecundación es más alto en FIV convencional (34.3%) que en ciclos de ICSI (10.3%) (Jaroudi et al., 2003), por tanto, la ICSI debe ser la primera opción en la EOD (Host et al., 1999). La ICSI debe ser la primera línea de tratamiento en las mujeres de más de 35 años (Oehninger et al., 2002).

El tratamiento activo de la EOD debe seguir un orden progresivo que vaya desde la baja complejidad, hasta, si es necesario, aplicar el tratamiento más sofisticado. Si se demuestra Chlamydia: doxiciclina o azitromicina en ambos miembros de la pareja (eficaz en la mayoría de los casos de leucospermia, cervicitis o endometritis). Tratamiento expectante, si no hay resultado en un periodo determinado por la edad de la paciente pasaremos a estimulación ovárica con citrato de clomifeno o gonadotropinas y coito dirigido, por último, si continuamos sin resultados pasaremos a Gonadotropinas + IIU (3-4 ciclos) y si fracasamos terminaremos con ICSI (+ aCGH/SGP si procede).

- **Efecto de la EOD sobre los resultados obstétricos**

Las mujeres con EOD presentan un riesgo más alto de complicaciones obstétricas, que persiste aún después de ajustar por edad, paridad, y tratamiento de fertilidad. Las razones permanecen sin aclarar (Pandian et al., 2001). Presentan mayor incidencia que la población general de pre-eclampsia, abruptio placentae, parto pretérmino, indicación de

inducción de parto y cesárea urgente, sin embargo, no presentan mayor incidencia de patología obstétrica (Omland et al., 2005).

- **Estilo de vida y contaminantes**

Exposición a tóxicos como el tabaco, alcohol, drogas, contaminantes, además del estrés, alimentación, ejercicio físico, etc. suponen un tema de debate y lo trataremos más adelante.

### **1.3. INFERTILIDAD: FACTORES, EPIDEMIOLOGÍA, FISIOPATOLOGÍA, CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**

En los últimos 20 años, el diagnóstico y tratamiento de las parejas con problemas de fertilidad han cambiado de manera notable. Como expusimos al principio, el panorama se ha visto modificado por varios factores, entre los que cabe destacar el incremento en el número de parejas que consultan por esterilidad, el acceso tardío de la mujer a la maternidad y la mejora sustancial en los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA).

Como decíamos al principio, la esterilidad se define como la incapacidad de una pareja para conseguir una gestación tras 1 año de relaciones sexuales con frecuencia normal y sin medidas contraceptivas. Se ha aceptado esta definición teniendo en cuenta algunos conceptos importantes referentes a la fertilidad humana. En este sentido, debemos considerar que la fecundabilidad es la tasa de concepción en una determinada población en un tiempo concreto, y la tasa de fecundidad mensual (TFM) es la probabilidad de conseguir un embarazo en un ciclo menstrual.

Teniendo en cuenta estudios basados en modelos matemáticos, en una población determinada existirían diferentes categorías de parejas en función de su fertilidad. Por una parte, tendríamos parejas «superfériles» con una TFM de un 60% que conseguirían un 100% de gestaciones en 6 meses; y por otra, parejas con una esterilidad absoluta con una TFM de 0. Entre ambos extremos tendríamos las parejas con una fertilidad normal, con una TFM de un 20%, con una posibilidad de gestación al año de un 93%, y las parejas con subfertilidad moderada y severa, cuya TFM variaría entre un 5 y un 1%.



La TFM está íntimamente relacionada con la *edad*, de ahí que en la actualidad este va a ser un factor determinante en el número de consultas por esterilidad, puesto que, teniendo en cuenta lo anteriormente citado, la proporción de parejas con subfertilidad moderada se ha incrementado de manera notable (Alkolombre, 2014).

La prevalencia real de la esterilidad se estima en un 15-18% de la población en edad reproductiva, aunque existen múltiples factores demográficos y socioeconómicos que dificultan precisar con exactitud esta prevalencia. Aunque el varón es responsable del 25-35% de los casos, la edad avanzada de las mujeres con deseo reproductivo puede considerarse como la principal causa actual de incremento de la esterilidad en nuestro medio. Tal como se ha comentado anteriormente, la TFM disminuye con la edad, por tanto, en los países occidentales la prevalencia de la esterilidad se ha incrementado a expensas de subfertilidades, que condicionan la capacidad reproductiva de las parejas (ESHRE Capri Workshop, 2010).

En general, podemos resumir los datos epidemiológicos en los siguientes puntos:

- El potencial reproductivo de la especie humana es *bajo*.
- La tasa de fecundabilidad mensual máxima en una pareja < 30 años no supera el 30%.
- El 60% logra gestación en 6 meses, 80% en 12 meses y 90% en 18 meses.
- El resto: 15-18% se consideran parejas estériles.
- En países industrializados la incidencia oscila en torno a 1200 parejas por millón de habitantes y año (OMS, 2010).
- España 54.000 parejas. Andalucía: 10.000. Málaga provincia: 1.200 (INE, 2012).

### **1.3.1. Concepto y epidemiología de la infertilidad**

El aborto de repetición (AR) se considera en el momento actual como una enfermedad diferente a la esterilidad, y se define como la pérdida espontánea de dos o más gestaciones.

Aunque la incidencia real del AR no está determinada con exactitud por las diferencias conceptuales y los criterios de inclusión o exclusión empleados, se estima que el problema se presenta entre el 2-5% de mujeres en edad genésica.



Existen diferentes aspectos que dificultan el establecimiento de unas recomendaciones categóricas en el manejo del AR, tales como la falta de estandarización de definiciones y conceptos, la heterogeneidad de los estudios sobre el tema, el desconocimiento del valor real de los posibles factores etiológicos, la dificultad en la valoración de ciertos factores ambientales y estilo de vida (exposición a tóxicos, tabaquismo, alcohol, cafeína, obesidad, etc.), la carencia de un gold standard fiable para diferentes test diagnósticos, el desconocimiento del pronóstico exacto en la mujer con un test anómalo no tratado, la posibilidad de que exista un problema multifactorial, la dificultad para la realización de estudios aleatorizados sobre tratamientos específicos y la discrepancia existente entre diferentes protocolos diagnóstico-terapéuticos.

Por todo ello, las recomendaciones sobre AR para el clínico-práctico han de establecerse en ocasiones a partir de datos que no proceden de una medicina basada en la evidencia, sino de las opiniones o consensos de expertos y de la evidencia proporcionada por estudios que, si bien no son aleatorizados, indican claramente que los beneficios de una conducta determinada superan los posibles efectos adversos, siendo el resultado global positivo.

### **1.3.2. Inicio del estudio y estrategia diagnóstica**

El aborto se define como la interrupción espontánea del embarazo antes de la semana 21 de gestación, y acaba con la muerte y expulsión de un feto de  $\leq 500$  g de peso. El embarazo bioquímico es un término que va asociado al concepto de fracaso implantatorio. Por «pérdida gestacional» se entiende la interrupción espontánea del embarazo antes de la semana 29, si bien se acepta que el AR y la pérdida gestacional de repetición delimitan poblaciones muy similares, ya que las interrupciones del embarazo repetidas exclusivamente entre las semanas 21 y 28 son poco frecuentes.

Así como el concepto de «aborto» establecido por la OMS se acepta universalmente, no existe consenso en la literatura acerca de lo que debe catalogarse como AR, y menos aún acerca de cuándo hay que iniciar el estudio diagnóstico del problema. Así, tanto el ACOG como la ASRM definen el AR como dos o más abortos, y aconsejan iniciar el estudio basándose en esta definición, mientras que el RCOG y la ESHRE (2006) lo definen a partir de tres abortos (también llamado aborto habitual). Sin embargo, existen una serie de razones que hacen aconsejable que el estudio diagnóstico se inicie ya a partir de dos abortos: a) la posibilidad de tener un nuevo aborto tras dos abortos previos es de un 25%,

muy superior a la esperada por azar (0,3%); b) el número de abortos previos (junto con la edad materna) constituye el factor predictivo más importante de nuevo aborto; c) el riesgo de aborto aumenta de forma progresiva con el número de gestaciones previas malogradas; d) esperar a iniciar las exploraciones hasta producirse un tercer aborto no aumenta las posibilidades de detectar una causa determinada responsable del problema, y e) hay que tener en cuenta las connotaciones particulares de cada pareja (edad de la mujer, factores psicoemocionales, historia obstétrica, etc.), que hacen aconsejable el inicio de las exploraciones en un momento dado.

**1.3.3.** Las **causas** propuestas como responsables del AR se pueden dividir en tres grupos:

- ✓ Causas demostradas: genéticas y síndrome antifosfolípido.
- ✓ Causas no demostradas, pero altamente probables: alteraciones anatómicas uterinas y trombofilias.
- ✓ Causas poco probables y en investigación: endocrinas, infecciosas, autoinmunes y factor masculino.

➤ ***Causas genéticas***

Se sabe que, en un 3-5% de los casos de AR, existe una anomalía estructural en los cromosomas paternos, con doble frecuencia en la madre. Las alteraciones más frecuentes son las translocaciones equilibradas (el 60%, recíprocas; el 40%, robertsonianas), seguidas de las inversiones y otras de menor prevalencia, como las inserciones, deleciones, duplicaciones o cromosomas en anillo.

El riesgo de aborto en parejas con translocaciones recíprocas o robertsonianas oscila entre el 35-64%. Por lo tanto, el hecho de ser portador de una cromosomopatía no conduce con seguridad al aborto en la descendencia y constituye un claro ejemplo de cómo pueden existir recién nacidos vivos entre abortos en parejas con causa identificable.

Sin embargo, la mayor parte de las cromosomopatías causantes de aborto se originan de novo en los gametos o en los embriones, por errores meióticos o mitóticos, aumentando en frecuencia conforme lo hace la edad materna. De este modo, en alrededor de un 50-70% de los productos abortivos de primer trimestre pueden observarse alteraciones cromosómicas. En las pacientes <35 años predominan las alteraciones cromosómicas estructurales, mientras que en pacientes >35 años son más frecuentes las triploidías (Lee et al., 2015).

Si bien la realización del cariotipo en sangre periférica a la pareja es un hecho aceptado, es más controvertido el análisis genético del producto de la concepción abortado. La cuestión está en la creencia o no de la aneuploidía recurrente como origen del AR. No existe evidencia de que esto sea así; sin embargo, la presencia de una aneuploidía en el aborto indicaría una mayor probabilidad de éxito en una gestación posterior, mientras que abortos euploides harían pensar en un factor no genético asociado al aborto.

El manejo terapéutico del AR asociado a la presencia de una alteración cromosómica en la pareja o en el producto de la concepción incluye la conducta expectante, el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) y la donación de gametos.

Aunque el pronóstico reproductivo en estas parejas varía en función de la anomalía cromosómica de la que sean portadores, este pronóstico en parejas con una translocación robertsoniana es mejor de lo que cabría esperar. Así, en ausencia de tratamiento existiría hasta un 70% de posibilidades de recién nacido normal. Por otra parte, el riesgo de un recién nacido vivo con una translocación desequilibrada es bajo, generalmente inferior al 1%. El DGP se ha utilizado en parejas con AR y portadoras de una anomalía cromosómica. Sin embargo, la alta probabilidad de una descendencia cromosómicamente normal o con una translocación equilibrada tras una gestación espontánea cuestiona la utilidad clínica del DGP en estos casos (Lee et al., 2015).

### ➤ *Síndrome antifosfolipídico*

Es la única causa no genética que ha demostrado invariablemente, a través de ensayos clínicos prospectivos aleatorizados, revisiones sistemáticas y metaanálisis, ser origen del AR, pues su tratamiento etiológico reduce de manera significativa la probabilidad de un nuevo aborto (Meroni et al., 2014). Se considera responsable de un 10-15% de los casos. Su diagnóstico ha de ser exhaustivo; es necesario que se cumplan exactamente los criterios aceptados para su definición (Tabla 7). El síndrome antifosfolipídico (SAF) es una trombofilia adquirida que puede aparecer sola (primario) o asociada a enfermedades neoplásicas, hematológicas, autoinmunitarias, tóxicas o infecciosas (secundario).

El SAF parece actuar de dos maneras distintas en la génesis del aborto: a) efecto trombogénico arterial y venoso, y b) desequilibrio hormonal y una deficiente invasión trofoblástica endovascular. Estos mecanismos fisiopatológicos explicarían la eficacia de la heparina y el ácido acetilsalicílico. Un metaanálisis y una revisión reciente de la base de datos Cochrane han demostrado que la adición de la heparina

a la aspirina en bajas dosis reduce drásticamente la probabilidad de un nuevo aborto (54%) (de Jong et al., 2014; Nizard et al., 2014).

**Tabla 7.** Criterios diagnósticos del síndrome antifosfolípido

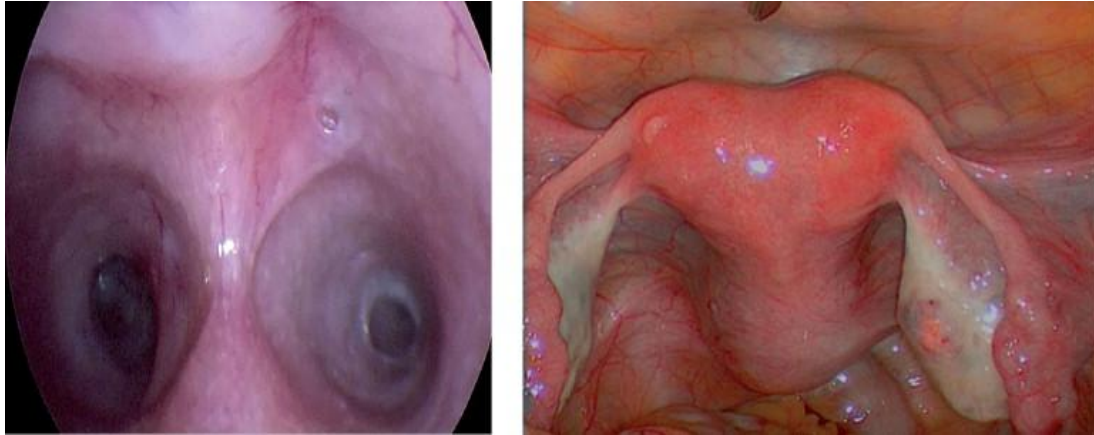
<b>Criterios clínicos</b>
<b>Trombosis vascular</b>
≥1 episodio clínico de trombosis arterial, venosa o capilar, en cualquier tejido u órgano.
<b>Complicaciones arteriales</b>
1. ≥1 muerte inexplicada de fetos morfológicamente normales de >10 semanas de gestación; o
2. ≥1 parto prematuro de neonatos morfológicamente normales de ≤34 semanas de gestación a causa de eclampsia, preeclampsia severa o insuficiencia placentaria grave; o
3. ≥3 abortos espontáneos consecutivos inexplicados de ≤10 semanas de gestación.
<b>Criterios analíticos</b>
<b>Anticuerpos anticardiolipina</b>
Isotipos IgG o IgM en suero o plasma en niveles moderados o altos (>40 GPL o MPL, o >percentil 99) en dos ocasiones separadas por 12 semanas o más, medidos por ELISA estandarizado.
<b>Anticuerpos anti-β<sub>2</sub> glucoproteína I</b>
Isotipos IgG o IgM en suero o plasma en niveles moderados o altos (>percentil 99) en ≥2 ocasiones separadas por 12 semanas o más, medidos por ELISA estandarizado.
<b>Anticoagulante lúpico (AL)</b>
AL detectados en sangre en ≥2 ocasiones separadas por 12 semanas o más, según las normas de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia.
<b>ELISA, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.</b>
<b>Criterios diagnósticos del síndrome antifosfolípido *</b>
* El diagnóstico de síndrome antifosfolípido requiere la presencia de al menos un criterio clínico y uno analítico. No existe límite en el intervalo entre el evento clínico y los hallazgos de laboratorio.

### ➤ **Alteraciones uterinas**

Las alteraciones de la anatomía uterina, congénitas o adquiridas, llevan muchos años relacionándose con el AR; sin embargo, ningún estudio aleatorizado hasta el momento ha demostrado que al corregir un problema uterino determinado las pacientes intervenidas aborten menos que las no operadas. La evidencia de su relación casual se basa fundamentalmente en estudios retrospectivos.

De todas las anomalías uterinas que se asocian con más fuerza a la pérdida fetal destacan las anomalías müllerianas de origen congénito. La más frecuente y de peor pronóstico es el útero septo (Fig. 7). Otras posibles son el útero bicorne, unicorne y didelfo, aunque con menor prevalencia. El útero arcuato no parece estar asociado con el AR. El diagnóstico de estas malformaciones uterinas se realizará por ecografía 3D, resonancia

magnética nuclear e histerosalpingografía (Venetis et al., 2014). Actualmente, solo las intervenciones poco agresivas parecen justificadas en el marco del origen uterino del los AR. De este modo, en las mujeres que abortan se suele recomendar *la septoplastia transhisteroscópica* en los casos del útero septo (Mollo et al., 2009).



**Figura 7.** Visión histeroscópica y laparoscópica del útero septo

En toda paciente con anomalía uterina congénita se aconseja llevar a cabo un control exhaustivo de la longitud cervical por ecografía vaginal una vez que se consiga una gestación. La evidencia más actual muestra que en gestaciones únicas con antecedente de aborto tardío o parto prematuro el cerclaje cervical mejora el pronóstico gestacional, al aumentar significativamente el tiempo de gestación. La progesterona vaginal iniciada en el segundo trimestre ante un acortamiento cervical también parece disminuir el riesgo de parto prematuro.

Aunque existe escasa evidencia que las sinequias intrauterinas, los miomas submucosos y los pólipos endometriales estén implicados en la etiología de los AR, la simplicidad del tratamiento histeroscópico justifica su realización (Comte et al., 2014)

#### ➤ **Trombofilias**

Las trombofilias representan un grupo de patologías que se caracterizan por un desequilibrio entre los sistemas de coagulación y fibrinólisis a favor del primero. Las trombofilias congénitas, en concreto el factor V Leiden y la mutación G20210A de la protrombina, aumentan de dos a tres veces el riesgo de pérdidas gestacionales, fundamentalmente del segundo y tercer trimestre. En estos casos estaría indicado su estudio,

sin embargo, existe escasa evidencia sobre la efectividad de su tratamiento (Aksoy et al., 2005)

➤ *Causas endocrinas*

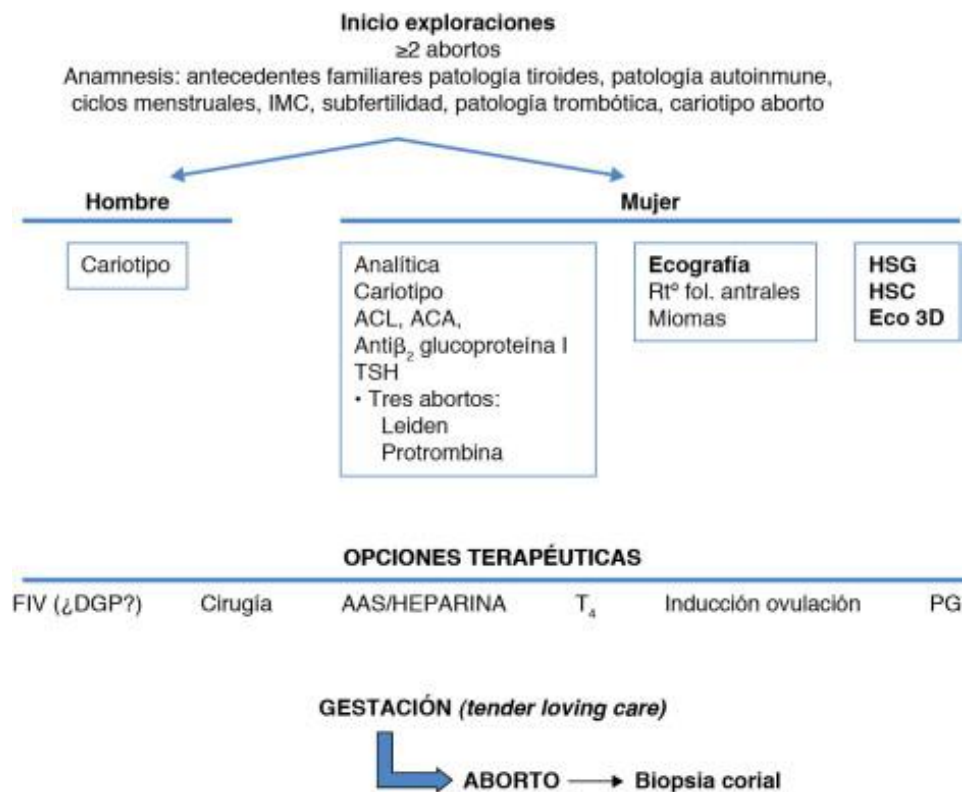
Actualmente se considera que tanto la diabetes mellitus como el hipotiroidismo, si están bien controlados, no explican el AR. En los últimos años se ha sugerido que el hipotiroidismo subclínico podría estar relacionado con pérdidas gestacionales precoces; sin embargo, no existen datos sólidos que justifiquen su tratamiento en AR.

La obesidad se ha relacionado con un incremento en el riesgo de aborto. Parece ser que algún factor asociado a la resistencia a la insulina de estas pacientes podría desempeñar algún papel relevante.

La insuficiencia de cuerpo lúteo se presenta como una de las alteraciones más controvertidas y con menor consistencia en la bibliografía actual como origen de AR. No hay ensayos controlados adecuados que hayan probado su implicación, ni existen estudios convincentes que muestren que su tratamiento mejore la evolución de la gestación en mujeres con este problema (Pluchino et al., 2014).

Las causas infecciosas, masculinas y aloinmunes no han demostrado ser responsables de AR.

El protocolo diagnóstico-terapéutico del AR basado en la información presentada anteriormente, y considerado desde un punto de vista eminentemente clínico y práctico, quedaría resumido en la figura 8.



**Figura 8.** Diagnóstico y tratamiento de una pareja con abortos de repetición. AAS, ácido acetilsalicílico; ACA, anticuerpos antinucleares; ACL, anticuerpos anticardiolipina; DGP, diagnóstico genético preimplantacional; FIV, fecundación *in vitro*; HSC, histeroscopia; HSG, histerosalpingografía; IMC, índice de masa corporal; PG, progesterona; TSH, hormona estimulante de la glándula tiroides.

#### 1.4. ESTUDIO DE LA PAREJA ESTÉRIL

Está ampliamente aceptado que el estudio debe iniciarse cuando la pareja se ha expuesto de manera repetida a la posibilidad de un embarazo durante 12 meses sin conseguirlo; sin embargo, el estudio podrá iniciarse antes en mujeres de más de 35 años, o bien cuando existen datos en la historia clínica de la pareja suficientemente sólidos como para pensar que existe una causa suficientemente justificada. Sería el caso de pacientes con anovulación, con antecedentes patológicos que orienten hacia una patología tuboperitoneal (cirugía tubárica previa, endometriosis, etc.), o bien por hechos que orienten hacia una causa masculina (cirugías testiculares, tratamientos quimioterápicos etc.).

En el ámbito de la esterilidad humana, hay pocos trastornos que sean «causa absoluta» de esterilidad, mientras que son más frecuentes las alteraciones que se comportan como «factores causales». Por tanto, la presencia de alteraciones en los órganos o en las



funciones implicadas en la reproducción no siempre explica la esterilidad. Es decir, no todos los trastornos presentes en una pareja tienen trascendencia clínica ni condicionarán en la misma medida la conducta posterior del médico. En la práctica, interesa especialmente detectar factores causales claramente asociados con la disminución de la probabilidad de embarazo y que resulten tratables mediante los procedimientos disponibles.

El estudio clásico de la pareja con problemas de fertilidad incluía el seminograma, la histerosalpingografía, el test poscoital, la biopsia del endometrio y la laparoscopia, con el objetivo de identificar los denominados «factores» responsables de la esterilidad; sin embargo, algunos estudios han demostrado la ineficacia de alguno de ellos, ya que el tratamiento de los trastornos diagnosticados no se correlacionaba con una mejora en la probabilidad de embarazo.

Los criterios actuales para la selección de las pruebas diagnósticas han evolucionado desde posiciones orientadas a la identificación exhaustiva de cualquier posible trastorno hacia la aplicación más selectiva de las pruebas, teniendo en cuenta fundamentalmente la fiabilidad y la utilidad clínica.

En relación con las pruebas diagnósticas, y siguiendo los criterios de eficacia ya mencionados, solo se deben considerar de aplicación sistemática tres grupos de pruebas (Marshburn, 2015):

1. Análisis de la calidad seminal.
2. Pruebas de normalidad anatómica y funcional del útero y las trompas de Falopio.
3. Pruebas para establecer la calidad de la ovulación.

Antes de realizar pruebas diagnósticas, será necesaria una correcta *anamnesis* que incluya:

- Duración de la esterilidad.
- Historia menstrual (edad de la menarquia, duración de los ciclos o presencia de dismenorrea).
- Gestaciones anteriores (con la pareja actual o anteriores). Evolución de las mismas y patología asociada.
- Frecuencia coital.
- Antecedentes quirúrgicos, ingresos hospitalarios y enfermedades de transmisión sexual.



- Presencia de patología tiroidea.
- Historia familiar de malformaciones fetales, retraso mental o menopausia precoz.
- Hábitos tóxicos (alcohol, tabaco, etc.).

La *exploración física* de la mujer incluirá una revisión ginecológica completa, con citología cervicovaginal, y además una valoración de:

- Índice de masa corporal (IMC).
- Exploración de la glándula tiroidea.
- Exploración mamaria: galactorrea, nódulos, etc.
- Signos clínicos de hiperandrogenismo (hirsutismo, acné).

#### **1.4.1. Análisis de la calidad seminal**

El seminograma es la prueba diagnóstica que valora la calidad del semen. Los valores del seminograma tienen una alta variabilidad biológica, por lo que se requieren dos muestras que difieran entre 1 y 3 semanas. Los últimos criterios establecidos por la OMS en 2010 consideran que podemos considerar una esterilidad de causa masculina cuando el volumen es inferior a 1,5 ml, el conteo de espermatozoides es inferior a 15 millones/ml, el conteo total de espermatozoides móviles es inferior al 32 millones y la morfología normal es inferior al 4%, según criterios estrictos.

Además del seminograma, hay aspectos esenciales que deben constar en una correcta anamnesis: antecedentes personales del nacimiento, infancia desarrollo y pubertad, existencia de prematuridad, malformaciones congénitas, sobre todo las genitourinarias, presencia de hipospadias, criptorquidia o hernias, infecciones víricas, como la parotiditis, sobre todo cuando es pospuberal y se asocia a orquitis bilateral. Se debe investigar si se han utilizado tratamientos hormonales, radioterapia o quimioterapia, si en el ámbito laboral se ha trabajado con tóxicos, venenos, fuentes de calor, radiaciones, etc. Otros aspectos que hay que considerar son antecedentes quirúrgicos (genitales, pélvicos), infecciosos (uretritis, prostatitis, enfermedades venéreas) y la presencia de enfermedades sistémicas (diabetes, hipotiroidismo, insuficiencia renal, hepática, etc.) (Bjorndahl, 2011).

Cuando los parámetros seminales lo justifican, se requiere una valoración andro-urológica que puede ir acompañada de exploraciones complementarias (Asero et al., 2014):

- Cariotipo y microdeleciones del cromosoma Y: en casos de azoospermia o de oligozoospermia (<5 millones/ml).
- Test de recuperación de espermatozoides móviles (REM): ayuda a seleccionar la TRA aplicada. Las técnicas más aceptadas son las que utilizan centrifugación (swim-up y gradientes de densidad). El resultado de la recuperación de espermatozoides debe expresarse en concentración de espermatozoides móviles progresivos (millones/ml). Se considera que valores de REM > 2 millones permiten realizar inseminación artificial, mientras que valores inferiores indicarían una fecundación in vitro (FIV) y/o inyección espermática intracitoplasmática (ICSI).
- Cultivo de semen: en casos de hipospermia, hemospermia, leucocitospermia, aglutinación o antecedente de infecciones urogenitales.
- Estudio del gen de la fibrosis quística: en casos de azoospermias y oligoastenozoospermias severas. Cuando la exploración urológica sugiere una agenesia uni- o bilateral de conductos deferentes.
- Determinación de FSH: en casos de azoospermia.

#### **1.4.2. Pruebas de normalidad anatómica y funcional del útero y las trompas de Falopio**

La histerosalpingografía (HSG) sigue considerándose la exploración fundamental para la valoración de la cavidad uterina y la permeabilidad tubárica. Aporta información sobre posibles malformaciones uterinas, aunque en la mayoría de estos casos se requiere la utilización de otras pruebas diagnósticas, como la ecografía vaginal tridimensional, la resonancia nuclear magnética o la histeroscopia (HSC). También es capaz de detectar otras anomalías endouterinas, como adherencias, miomas submucosos y pólipos endometriales. Algunos autores han preconizado la utilización de la sonohisterografía, que permitiría obtener información sobre la cavidad uterina y la permeabilidad tubárica, además de sobre la presencia de una posible patología anexial.

La HSG es la prueba de elección para la valoración de la permeabilidad tubárica. Tiene un valor predictivo positivo (VPP) de un 38% y un valor predictivo negativo (VPN) de un 94% para la detección de patología tubárica. Esto significa que, cuando

demuestra permeabilidad tubárica, en la mayoría de los casos descarta patología; sin embargo, cuando sugiere patología, su potencia diagnóstica es muy limitada.

En los casos con HSG patológica, podría estar indicada la laparoscopia diagnóstica con cromotubación; sin embargo, el papel de la laparoscopia diagnóstica en la actualidad ha quedado relegado a casos en que las exploraciones realizadas sugieren la presencia de una patología anexial tributaria de tratamiento endoscópico (hidrosálpinx, endometriomas).

En los últimos años se ha sugerido la determinación de la serología anti-Chlamydia para la detección de patología tubárica; sin embargo, aunque mejora el VPP de la HSG, el VPN es similar, por lo que no se considera un test diagnóstico en la práctica clínica habitual.

En la actualidad, se acepta que la HSG y la ecografía transvaginal son las pruebas diagnósticas imprescindibles a realizar en este apartado diagnóstico. La ecografía nos dará información acerca de una posible patología uteroanexial tributaria de tratamiento quirúrgico y también sobre el recuento de folículos antrales (RFA), que es un aspecto relacionado con la reserva folicular ovárica de gran valor pronóstico (Kamel, 2010).

La HSG nos dará información sobre la cavidad uterina, que, en caso de sospecha de patología, será confirmada por la HSC. La laparoscopia diagnóstica no se realizará de manera rutinaria en la paciente en estudio por esterilidad (ESHRE, ASRM, SEF).

#### **1.4.3. Pruebas para establecer la calidad de la ovulación**

La disfunción ovulatoria es la principal causa de esterilidad en aproximadamente un 20% de parejas. Se considera que ciclos entre 25-35 días traducen una correcta ovulación. Datos obtenidos de la anamnesis pueden sugerir causas responsables de trastornos ovulatorios; por ejemplo, índice de masa corporal, disfunción tiroidea, galactorrea, ejercicio físico excesivo, hirsutismo, etc.

Aunque la historia clínica en la mayoría de los casos ya nos informa de una disfunción ovulatoria, existen pruebas que nos permiten corroborarlo. La más aceptada es la determinación de progesterona plasmática en segunda fase del ciclo (día 21). Se considera que unos niveles superiores a 3 ng/ml demuestran una ovulación reciente.

Otros métodos para confirmar la ovulación serían la determinación de la temperatura basal, la determinación de los valores de LH urinaria, mediante los llamados ovulation predictors kits, la biopsia endometrial y el control ecográfico de la ovulación. Todos estos métodos no se aconsejan en la práctica clínica diaria por su inexactitud, incomodidad y cuestiones logísticas.

Ante el diagnóstico de una disfunción ovulatoria debemos completar el estudio con:

- *Determinaciones hormonales:* FSH, LH, estradiol, andrógenos (testosterona, androstenediona) 17OH progesterona, prolactina, TSH, T4, insulinemia.
- *Ecografía transvaginal:* nos informará de la ecoestructura ovárica, orientando hacia el diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico (SOP).
- *TAC y/o RMN:* en casos de sospecha de patología hipotálamo-hipofisaria.
- *Cariotipo:* en casos de sospecha diagnóstica de disgenesia gonadal.

El resultado de todas estas exploraciones nos permitirá incluir a la paciente en uno de estos tres tipos de anovulación establecidos por la OMS en 1973:

1. Anovulación tipo I de la OMS: sin evidencia de producción estrogénica. Niveles normales de prolactina. Niveles normales o bajos de FSH. Sin privación con la administración de gestágenos.

2. Anovulación tipo II de la OMS: evidencia de producción estrogénica. Niveles normales de prolactina y FSH. Menstruación tras la administración de gestágenos. La mayoría de estas pacientes corresponden a pacientes con SOP cuyos criterios diagnósticos actuales fueron establecidos en Rotterdam en 2003.

3. Anovulación tipo III de la OMS: anovulación hipergonadotropa. Niveles elevados de FSH y LH, compatibles con fallo ovárico.

Esta clasificación tiene un gran interés práctico, porque va a condicionar los diferentes tratamientos inductores de la ovulación.

En la anovulación tipo I de la OMS será necesaria la utilización de preparados que contengan FSH y LH, mientras que en las pacientes con anovulación tipo II de la OMS

se podrán utilizar citrato de clomifeno, inhibidores de la aromatasas y FSH. En las pacientes del tercer grupo no será posible la inducción de la ovulación y deberán recurrir a donación de ovocitos.

En este apartado del estudio del funcionalismo ovárico se debe realizar una valoración de la «reserva ovárica». Se entiende como reserva ovárica el pool de folículos primordiales existentes en los ovarios. Una disminución de la reserva ovárica traduce una disminución en la cantidad y calidad de los ovocitos y, si bien este es un proceso fisiológico que va ligado a la edad de la mujer, se sabe que se trata de una función biológica más que cronológica y que, en consecuencia, el momento de inicio de su disminución es muy variable. Es decir, que con frecuencia existe una discrepancia entre la edad cronológica y la denominada edad gonadal o biológica.

Las **pruebas diagnósticas** que nos permiten la reserva ovárica son:

- Determinación de la **FSH y estradiol basales**. Se deben incluir en el estudio básico de una paciente en estudio por esterilidad y deben realizarse entre el 2º-5º día del ciclo. Niveles de FSH > 10 UI/l se asocian a una peor respuesta a la estimulación ovárica y también a una peor fertilidad espontánea. Los niveles de estradiol deben determinarse también porque unos niveles normales de FSH, pero con estradiol (>60-80 pg/ml), se asocian también a un peor resultado reproductivo.

- Recuento de folículos antrales (**RFA**). Es la suma de folículos de 2-10 mm en ambos ovarios, realizada por ecografía transvaginal en fase folicular precoz. Recuentos inferiores a 4-5 folículos se asocian también a una pobre respuesta a la estimulación ovárica.

- Determinación de la hormona antimülleriana (**AMH**). Esta hormona se produce en las células de la granulosa de folículos preantrales pequeños y se considera en la actualidad el mejor marcador de reserva ovárica, por cuanto nos da información de estadios de la foliculogénesis previos a la fase dependiente de las gonadotropinas. Se puede determinar en cualquier día del ciclo y niveles inferiores a 1 ng/ml se asocian a una peor respuesta a la estimulación ovárica, a una peor calidad embrionaria y a una tasa de gestación inferior en ciclos de FIV. Su coste no justifica la determinación rutinaria en el estudio básico de la paciente estéril.

Con las diferentes pruebas diagnósticas tratadas hasta ahora quedarían sin evaluar las denominadas causas peritoneales de la esterilidad. Nos referimos, fundamentalmente, a la endometriosis y a las adherencias pélvicas.

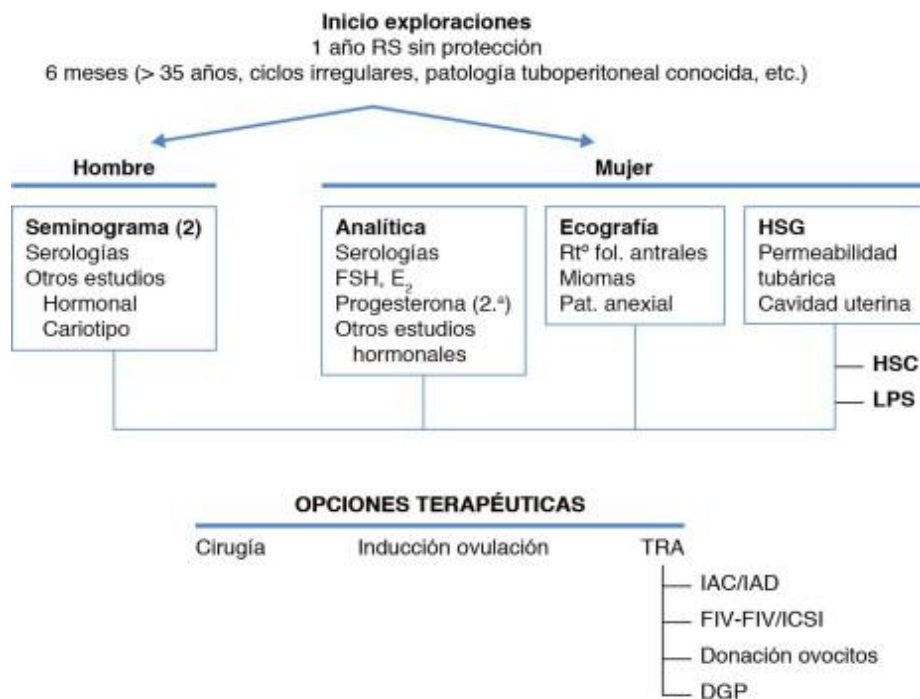
Con respecto a la endometriosis, estudios aleatorizados similares indicaron que el diagnóstico y tratamiento de la endometriosis mínima por laparoscopia eran poco importantes, ya que, aunque la tasa de gestación conseguida tras la ablación o escisión quirúrgica de los focos endometriósicos era superior al grupo de pacientes sin tratar, las diferencias eran muy pequeñas. Además, se concluyó que el número necesario de pacientes que había que tratar (NNT) era de 12, es decir, teniendo en cuenta que la prevalencia de la endometriosis en pacientes estériles es de un 30%, se deberían realizar 40 laparoscopias diagnósticas para diagnosticar 12 endometriosis que, tratándolas, permitirían conseguir una gestación. Teniendo en cuenta el coste-beneficio en estas pacientes, no estaría indicada la laparoscopia.

En cuanto a las adherencias pélvicas, la ecografía y la HSG nos pueden suministrar información que sugiera la presencia de las mismas. En estos casos, podría estar indicada la laparoscopia, pero con la intención de realizar gestos quirúrgicos previamente consensuados con la paciente, como podría ser la exéresis de un hidrosálpinx, o bien de cirugía tubárica conservadora.

Si se efectúa una revisión de las casuísticas de diferentes autores, se observa cómo existen considerables diferencias en la frecuencia relativa de los diferentes factores causales; sin embargo, podemos decir que la causa masculina está presente de manera exclusiva en un 20% de las parejas, pero puede estar presente hasta un 30-40% de las parejas. La causa ovárica o tubárica (o ambas) afecta en torno al 50% de las parejas, mientras que el resto de parejas presentan una esterilidad idiopática (Kamel, 2010).

Una vez finalizado el manejo diagnóstico de la pareja, orientaremos los tratamientos en función de los resultados realizando (Fig. 9):

- Tratamientos quirúrgicos: resección de patología endocavitaria, endometriomas, hidrosálpinx, etc.
- Inducción de la ovulación: clomifeno, gonadotropinas (pautas y tratamientos diferentes en función del tipo de anovulación).
- TRA: inseminación artificial, FIV, FIV/ICSI.



**Figura 9.** Diagnóstico y tratamiento de una pareja estéril. *DGP*, diagnóstico genético preimplantacional; *FIV*, fecundación *in vitro*; *HSC*, histeroscopia; *HSG*, histerosalpingografía; *IAC*, inseminación artificial con semen conyugal o de la pareja; *IAD*, inseminación artificial con semen del donante; *ICSI*, microinyección espermática; *RS*, relaciones sexuales; *TRA*, técnicas de reproducción asistida.

## 1.5. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA ACTUALES

### 1.5.1. Inseminación artificial

La tasa de gestación se ve afectada por la edad tanto en la inseminación artificial homóloga (IAH) como en la inseminación artificial con semen de donante (IAD). De acuerdo con el registro de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) del año 2005, la tasa de gestación en pacientes menores de 40 años en IAH fue del 12,6%, frente al 7,4% en pacientes con 40 años o más. De igual modo, la tasa de gestación con IAD fue significativamente más alta en las pacientes menores de 40 años (Tabla 8)

**Tabla 8.** Tasas de gestación en inseminación artificial (Registro ESHRE, 2005)

	IAH			IAD	
	<40 AÑOS	≥40 AÑOS		<40 AÑOS	≥40 AÑOS
Tasa de gestación(%)	12,6	7,4	Tasa de gestación(%)	18,9	9,2
Gestación única (%)	87,9	94,4	Gestación única (%)	88,0	93,5
Gestación gemelar (%)	11,2	4,9	Gestación gemelar (%)	10,8	6,5
Gestación triple (%)	2,3	0,7	Gestación triple (%)	1,2	0

Como regla general, se puede afirmar que los 38 años es la edad límite para alcanzar resultados aceptables, y que a partir de los 39 años las tasas de gestación son bajas. En la práctica clínica, la Unidad de Reproducción del Hospital Regional Universitario de Málaga realiza cuatro ciclos hasta los 37 años, pero si se trata de mujeres de 38 a 40 años, se pasa directamente a la FIV/ICSI. Si además se estudia la tasa de aborto en los diferentes grupos etarios, se observa un aumento de dicha tasa en función de la edad de la paciente, tanto en IAH como en IAD.

En un estudio reciente fueron evaluadas retrospectivamente las tasas acumuladas de recién nacido vivo en más de 7.000 ciclos de IAD. La tasa acumulada de recién nacido vivo aumentó progresivamente desde el 22,6% en el primer ciclo hasta el 38,4% en el segundo, el 48,8% en el tercero y el 72,6% en el sexto, alcanzando un porcentaje meseta en el octavo (81,2%). Se confirmó una disminución de las tasas de éxito en relación con la edad, de manera significativa en las mujeres de 38-39 años en el primer ciclo (14,5%), en el segundo (26,3%) y en el tercero (35,9%), con establecimiento del porcentaje meseta después del sexto ciclo (59,4%). Este efecto relacionado con la edad fue más marcado en las mujeres de 40 a 45 años, con tasas del 6,4% en el primer ciclo, el 13,9% en el segundo y el 21,2% en el tercero, y con el nivel máximo en el quinto ciclo con una tasa acumulada de recién nacido vivo de tan solo el 36,6% (Malchau et al., 2014).



### 1.5.2. FIV/ICSI

Al igual que en la inseminación artificial, la tasa de gestación también se ve limitada en la FIV/ICSI por la edad materna. Los datos que nos aporta el registro de la ESHRE del año 2006 son claros. Las tasas de gestación fueron del 28,2, el 22,2 y el 9,6% en las pacientes menores de 34, 35-39 y 40 o más años de edad, respectivamente. Se observa una disminución de ambas tasas según va aumentando la edad de las pacientes. En un reciente trabajo se analizaron retrospectivamente los resultados obtenidos en más de 2.000 ciclos de FIV en pacientes de 40 años o más. La tasa de gestación clínica por transferencia fue del 23,9%, la tasa de gestación por ciclo iniciado fue del 13,4% y la tasa de aborto, del 44,8%. Finalmente, la tasa de recién nacido por ciclo iniciado fue del 6,7%. El análisis de los diferentes grupos por edades demostró una diferencia significativa en la tasa de recién nacido vivo por ciclo iniciado entre pacientes menores de 43 años y las de 43 o más años (Tan et al., 2014).

Aunque los test de la reserva ovárica pueden ser buenos predictores de la respuesta a la estimulación, o en todo caso ayudar a elegir un protocolo o una medicación en las pacientes de edad avanzada, tienen limitaciones como predictores de las tasas de gestación o de recién nacido vivo. Recientemente se ha introducido la determinación de la hormona antimülleriana (AMH, *anti-Müllerian hormone*) en la valoración de la reserva ovárica, como veremos en el siguiente apartado de factores pronósticos. Algunos autores han establecido que los niveles de AMH se relacionan con el número de folículos, pero no con la calidad ovocitaria o la constitución cromosómica.

Una de las dificultades en las pacientes de edad avanzada es la baja respuesta a la estimulación ovárica que presentan muchas de ellas. Se han propuesto numerosas estrategias para aplicar en este tipo de pacientes, y el resultado de todas ellas tan solo es discreto.

### 1.5.3. Donación de ovocitos

La donación de ovocitos es la alternativa que se aplica en las pacientes de edad avanzada, fracaso de TRA anteriores con mala calidad ovocitaria o embrionaria, menopausia precoz y enfermedad genética no subsidiaria de DGP o tratamiento. El gameto femenino lo aporta una donante anónima diferente de la que va a recibir los embriones resultantes. Uno de los últimos avances dentro de los programas de donación de ovocitos ha

sido la incorporación de la *vitrificación*, lo que ha permitido la donación de ovocitos vitrificados anteriormente.

Dentro de las distintas indicaciones de la donación de ovocitos, la edad materna avanzada supone el mayor porcentaje según los protocolos de cada centro.

Uno de los factores que influyen en la implantación es la edad de la receptora. El envejecimiento del útero y la disminución de su receptividad han sido objeto de debate. Sin embargo, hace casi un decenio se publicó un estudio que recogía la experiencia en más de 17.000 casos de donación de ovocitos en Estados Unidos. En este trabajo se demostró que la tasa de gestación e implantación disminuía a partir de los 45 años (Gupta et al., 2012).

Otro de los problemas de todos los programas de donación de ovocitos es la aparición de sangrados inesperados, sin embargo, la edad de la paciente no parece tener relación alguna con la aparición o no de sangrado durante la preparación endometrial previa a la recepción de embriones procedentes de donación de ovocitos.

Desde la legalización de la congelación de ovocitos en España, se ha introducido este avance dentro de la práctica clínica diaria, concretamente en el programa de donación de ovocitos. Tras los primeros y prometedores resultados, la donación de ovocitos vitrificados se ha consolidado. Los ciclos de donación con ovocitos vitrificados, con una tasa de implantación de hasta el 62%, son comparables a la tasa de implantación con los ciclos de donación con ovocitos en fresco. La donación con ovocitos vitrificados supone una alternativa más para las pacientes de edad avanzada en las que la presión del tiempo es muy importante.

#### **1.5.4. Vitrificación de ovocitos**

La vitrificación de ovocitos ha venido a resolver problemas como la preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas, programas de ovodonación, acumulación de ovocitos para DGP o SGP en baja respuesta, retraso de la maternidad como opción personal, imposibilidad de obtener muestra espermática el día de la punción y maduración in vitro de ovocitos en caso de riesgo de SHO (Donnez et al., 2013).

Las pacientes con una respuesta ovárica baja representan un cierto desafío cuando hablamos de tratamientos de infertilidad. Una opción viable es la de acumular y vitrificar los ovocitos, lo que exige una cantidad variable de ciclos de estimulación para lograr obtener un número adecuado de ovocitos para la inyección intracitoplasmática de

espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*). La vitrificación es un método para preservar los ovocitos asociado a una excelente tasa de supervivencia tras la descongelación. La vitrificación de ovocitos tiene grandes ventajas, pues se obtiene igualmente un mayor número de embriones transferidos con una mayor tasa de embarazo en pacientes con una respuesta baja.

#### 1.5.5. Diagnóstico genético preimplantacional

El diagnóstico genético preimplantacional (*PGD, preimplantational genetic diagnostic*) fue desarrollado inicialmente para ayudar a las parejas con problemas genéticos o síndromes asociados a los cromosomas sexuales. Se planteó la hipótesis de que la selección de embriones euploides (para ciertos pares cromosómicos comunes) podría aumentar el éxito reproductivo. El PGD se encuentra ahora incluido como método de *screening* preimplantacional (*PGS, preimplantational genetic screening*) en ciertas situaciones como el fallo de implantación, el aborto recurrente y la edad materna avanzada (gran cantidad de embriones de mujeres de edad avanzada presentan aneuploidías).

En las pacientes de edad avanzada se tiende a recuperar un número de ovocitos menor, lo que disminuye el número de embriones que hay que transferir. En ciclos de PGS se obtienen incluso menos embriones. Es aquí donde la vitrificación de los ovocitos y de los embriones es de gran ayuda. Al acumular ovocitos mediante la vitrificación es posible obtener un mayor número de ellos para trabajar en el laboratorio. En varios estudios se ha observado que en ciertas pacientes con edad materna avanzada el PGS ayuda a mejorar los resultados reproductivos con ovocitos propios; las pacientes mayores de 40 años fueron las más beneficiadas (Coco, 2014).

### 1.6. FACTORES PRONÓSTICO EN FIV/ICSI

A continuación expondremos los aspectos más importantes relacionados con el tema, que hallamos tras una exhaustiva revisión de la literatura.

Los resultados en FIV/ICSI se tienden a medir hoy día en tasa de recién nacidos vivos más que en tasa de gestación. Estos factores van a depender fundamentalmente de las características individuales de la pareja (edad, hábitos, patologías, etc.), resultados de las pruebas complementarias (hormonas, recuento de folículos antrales,

seminograma, etc.) y resultados de tratamientos anteriores (número de ciclos, número de ovocitos, tasa de fecundación, calidad embrionaria, etc.).

Existen una serie de condicionantes socioeconómicos de la mujer trabajadora que conducen al retraso del primer embarazo, siendo los más comunes las uniones tardías, la influencia de hábitos, los altos ingresos personales, las mujeres urbanas y la competitividad laboral.

La sensibilización de la población con información insuficiente y sesgada acerca de las posibilidades de embarazo natural, resultados de reproducción asistida y complicaciones del embarazo, también influyen en el retraso de la maternidad.

La esterilidad/infertilidad afecta aproximadamente a un 15-18% de las parejas españolas, pero sólo un 2,9% nacen a través de las TRA (Registro SEF, 2013).

Los principales factores pronóstico en ciclos de FIV/ICSI los podemos resumir por un lado en variables asociadas a las características de la pareja, como la edad (fundamentalmente femenina), el IMC (fundamentalmente femenino), el tabaco y otros hábitos, el tipo de disfunción reproductiva (primaria/secundaria), la duración de la infertilidad, la duración del ciclo, las determinaciones hormonales, el número de folículos antrales, el volumen ovárico, la calidad seminal y la calidad embrionaria; y por otro lado en variables relacionadas con la respuesta ovárica a la estimulación, como el número de intentos previos, los días de estimulación, la dosis total de gonadotropinas, el número de folículos  $\geq 17$  mm, el día hCG, el nivel de estradiol el día de la hCG, el nivel de progesterona el día de la hCG, la relación estradiol / progesterona, el tipo de endometrio, el número de ovocitos, el número de embriones, la técnica de la transferencia embrionaria y el número de embriones transferidos.

En la revisión de la literatura para identificar los factores pronósticos que influyen en los resultados finales encontramos los siguientes:

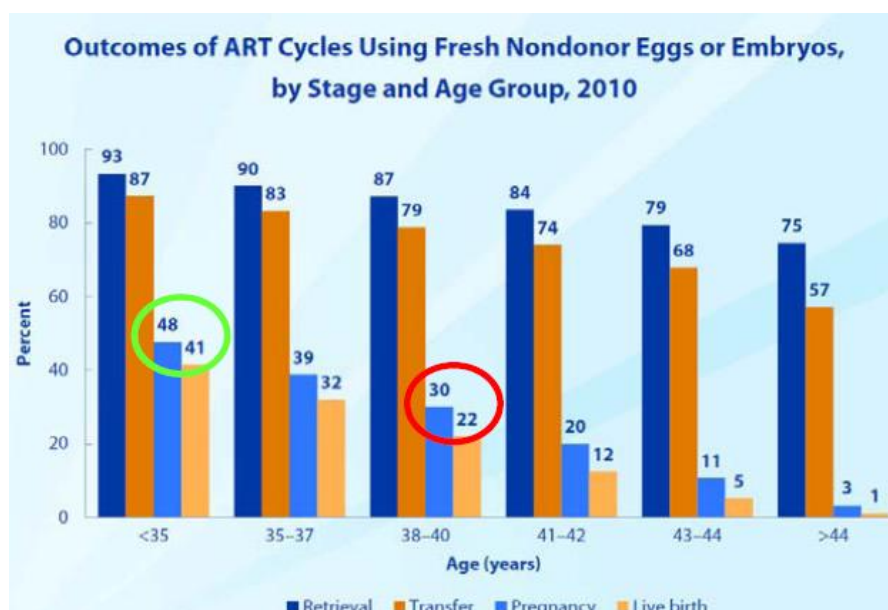
- Clínicos:
  - Edad (Martin et al., 2011).
  - Etiología y duración de la infertilidad
  - Índice de masa corporal (IMC) (Salha et al., 2001).
  - Hábitos tóxicos y estilos de vida (Anderson et al., 2010).
- Ultrasonidos:
  - Número de folículos antrales (Lass et al., 1997).

- Índices Doppler (resistencia) (Popovic-Todorovic, 2003).
- Volumen ovárico (Jaiswar et al., 2015).

- Niveles hormonales:

- FSH basal del tercer día / Estradiol (Bancsi et al., 2003).
- Inhibina B (Lukaszuk et al., 2014).
- AMH (Lukaszuk et al., 2014; van Roij et al., 2002).

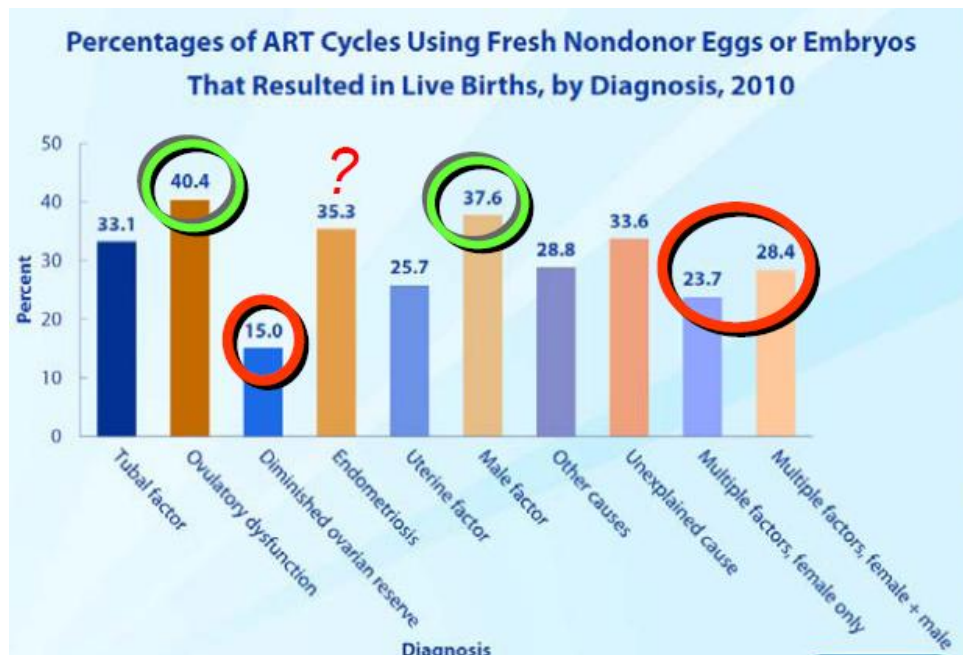
La **edad** de la mujer es el principal factor pronóstico de las TRA. En la figura 10 podemos ver el impacto de esta variable categorizada por intervalos de edad en cuanto a resultados de punciones, transferencias y RN vivo de ciclos en fresco, excluyendo donantes de ovocitos o embriones, con una caída prácticamente a la mitad de RN vivo (22%) a partir de los 38 años respecto a las menores de 35 (41%) (C.D.C. Annual report, 2010). Podemos decir que la edad de la paciente es el mejor predictor de embarazo (véase apartado 1.2.1).



**Figura 10.** Resultados de TRA según edad por punción, transferencia, gestación y RN vivo (C.D.C. 2010).

La **etiología de la esterilidad** es otro factor que influye en el pronóstico de la FIV, de manera que la causa de mejor pronóstico suele ser la disfunción ovulatoria, seguida

de la masculina pura y la de peor pronóstico la de reserva ovárica disminuida, ocupando la endometriosis un lugar intermedio (Fig.11).



**Figura 11.** % RN vivos según el diagnóstico de esterilidad (C.D.C. Annual report, 2010).

Los marcadores de reserva ovárica AMH y RFA son buenos predictores de respuesta con valor clínico similar, debiendo estar la AMH entre 1-3 ng/mL y el RFA entre 6-18 folículos menores de 10 mm. El rendimiento de la FSH basal es aceptable en la predicción de la cancelación del ciclo, su valor adecuado debe ser  $\leq 10$  mUI/mL. El estradiol basal también se utiliza como predictor de respuesta ovárica óptima y debe situarse por debajo de 50 pg/mL. La inhibina B hoy ya no se utiliza como marcador de reserva ovárica, aunque el punto de corte como predictor de embarazo se estableció en 45 pg/mL, por debajo del cual la probabilidad de éxito disminuye de manera significativa. El volumen ovárico  $< 3$  cc y el Doppler son marcadores menos utilizados (Broekmans et al., 2006; Broer et al., 2009; Lukaszuk et al., 2014).

La obesidad femenina, aunque la trataremos también en el apartado de estilos de vida, es otro de los factores pronósticos a tener en cuenta en los resultados de la FIV por los siguientes motivos: la prevalencia en España es un 38,5% con sobrepeso, un 14,5% es obeso (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2007), uno de cada dos adultos presenta un peso superior a lo recomendable, la obesidad es más frecuente en mujeres

(17,5%) que en varones (13,2%). La probabilidad de conseguir una gestación a través de un tratamiento de reproducción asistida se reduce casi en 33% en mujeres obesas ( $>30$  IMC), en un 50 % en muy obesas ( $>35$  IMC) (Wang et al., 2000). Por cada unidad de IMC:  $1 \text{ u} < 30$ , la probabilidad de embarazo en FIV aumenta en un 1,19 %. Trastornos menstruales, hirsutismo, infertilidad, aborto y complicaciones obstétricas son consecuencias de un IMC elevado (Mulders et al., 2003). La pérdida de peso y la corrección de la insulino-resistencia mejorará la ovulación y aumentará la fertilidad. Si el IMC  $> 35$  el tiempo de la concepción se duplica en ciclos naturales (Hassan et al., 2004). La probabilidad de gestación se reduce a la mitad con TRA (Wang et al., 2000).

El tabaco y la fertilidad en la mujer, aunque lo trataremos en el apartado de estilos de vida, aquí hay que considerar que es también un factor pronóstico de la FIV por los siguientes motivos: la prevalencia de tabaquismo en España es de un 24 % (SEPAR, 2007). El 30% de las mujeres y el 35% de los hombres en edad reproductiva son fumadores (ASRM, 2006). El efecto es dosis-dependiente y efectos peores a partir de 10 cigarrillos / día (Bolumar et al., 1996). La pérdida de la fecundidad asociada con el tabaquismo puede ser revertida en un año (Curtis et al., 1997; Hughes et al., 1997; Hughes et al., 1996). Mayor prevalencia de tests de reserva ovárica alterados (Sharara et al., 1994). Menor cantidad de ovocitos recuperados, con peor calidad ovocitaria y embrionaria. Incremento de anomalías cromosómicas en los ovocitos (Zenzes, 2000). La menopausia se produce uno a cuatro años antes (Baron et al., 1990; Mattison et al., 1978). Dosis mayores de gonadotropinas (Farhi et al., 2009). Más ciclos cancelados, tasas de implantación más bajas (Van Voorhis et al., 1996). Casi el doble del número de ciclos para conseguir una gestación. Meta-análisis con 7 estudios, OR de 1,79 (IC 95% 1,24-2,59) (Feichtinger et al., 1997).

La respuesta a la HEOC en ciclos anteriores es uno de los mejores predictores tanto de respuesta en el siguiente ciclo como de pronóstico en cuanto a resultados (Bancsi et al., 2003; Devroey et al., 2009; Howles et al., 2006; Humadian et al., 2010; Luke et al., 2010; Peñarrubia et al., 2005; van Loendersloot et al., 2010).

El endometrio, como responsable de la receptividad uterina, es otro de los factores pronósticos en el intermedio del proceso de la FIV. Son factores de buen pronóstico para la implantación un patrón ecográfico tipo A, B, un grosor endometrial  $> 6-8$  mm y una volumetría endometrial  $> 2,5$  mL (Zollner et al., 2003).

La selección del mejor espermatozoide en ICSI tiene implicación pronóstica en cuanto a resultados. Se puede realizar de forma convencional mediante el método de



gradientes de densidad o aplicando otros métodos y técnicas como la respuesta a condiciones del medio (selección de HOS test +, adquisición de movilidad frente a pentoxifilina), barreras biológicas o físicas (superar columnas con células del cúmulo, microfluídica), receptores o moléculas de membrana (recuperar espermatozoides unidos a ZP, unión al ácido hialurónico por el método PICSI, columnas de anexina-V-MACS), características físicas y morfología mejorada (IMSI, birrefringencia) y carga eléctrica superficial (potencial zeta, electroforesis) (Henkel, 2012). En los casos indicados de fallo repetido de implantación y aborto de repetición, antes de la selección de los mejores espermatozoides para la FIV/ICSI, se puede realizar estudio de la meiosis en biopsia testicular, donde podemos encontrar tres patrones: meiosis normal, anomalías sinápticas y bloqueo meiótico (Cantu et al., 1981). En el eyaculado existen tests como los de fragmentación de ADN espermático (cometa, TUNEL, SCSA) (Gandini et al., 2004; Greco et al., 2005; Morris et al., 2002) o screening de aneuploidías de espermatozoides mediante FISH (Ramasamy et al., 2015) (Ramasamy et al., FS 2015). En última instancia, estaría indicado el SGP en casos de fallo repetido de implantación y abortos de repetición si existen alteraciones en las pruebas, anteriormente mencionadas, realizadas al varón (Moutou et al., 2014).

El número de embriones transferidos es el segundo factor pronóstico, después de la edad de la mujer, que incide decisivamente en los resultados de la FIV, no sólo en cuanto a RN vivo, sino también en la tasa de gemelaridad. Lo ideal sería la transferencia selectiva de embrión único sin que se deteriorase la tasa de gestación y de RN vivo, pero dependiendo de la edad de la mujer, el número de intentos previos, la calidad embrionaria y los resultados de cada centro se pueden transferir de 1 a 3 embriones que es lo que permite la legislación vigente (Gelbaya et al., 2010; Weigert et al., 2001).

Por último, las variables relacionadas con la programación del ciclo de FIV, también tiene sus implicaciones en el resultado que puede verse afectado por el tipo de ciclo (largo vs corto), dosis, día de inicio, duración y combinación de las gonadotropinas, uso de anticonceptivos en ciclos con antagonistas de la GnRH, uso de estrógenos y retrasar o adelantar la hCG como veremos más adelante (van Loendersloot et al., 2010).

Los resultados de la FIV comparados con la reproducción natural tienen incrementados una serie de riesgos de patología obstétrica y perinatales entre los que destacan gestación múltiple x20, monocorionicidad x3, aborto espontáneo depende de la edad materna y no de la TRA, gestación ectópica x3, heterotópica x10, mortalidad



intrauterina y perinatal en gestaciones simples x2 (en gemelos es menor), preeclampsia x1,8, placenta previa x3, desprendimiento de placenta x2, diabetes gestacional x2, cesárea x2, parto prematuro en gestaciones simples x2 (igual en FIV e ICSI) (se discute en gemelos), bajo peso al nacer y para la edad gestacional en gestaciones simples x2 (igual en FIV e ICSI) (no aumenta en gemelos), anomalías congénitas mayores x1,3, anomalías cromosómicas tras ICSI sexuales x3 y autosómicas x5. (C.D.C. Annual report, 2010).

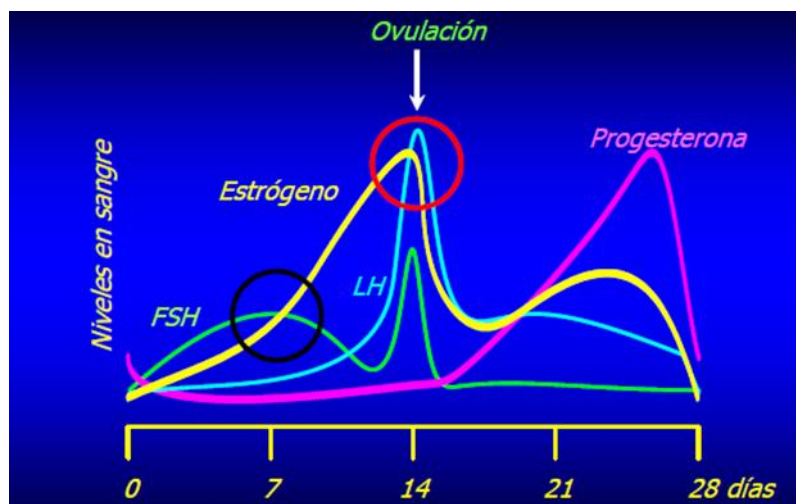
La tasa de anomalías congénitas en la población general está en un 1,8 %, mientras que en TRA alcanza casi un 2,9 %. Teóricamente pueden producirse anomalías congénitas derivadas de las TRA por alteraciones en los gametos y por cambios epigenéticos (pautas de estimulación, ICSI, medios de cultivo, etc.) (El-Chaar et al., 2009).

## **1.7. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN FIV/ICSI**

Con la hiperestimulación ovárica controlada (*HEOC*) en FIV/ICSI pretendemos un desarrollo folicular múltiple con el objetivo de alcanzar un número de 6-18 folículos que consideramos una respuesta óptima para lograr recuperar una media de  $13,1 \pm 2,7$  ovocitos y así maximizar la tasa de gestación en el primer ciclo sin aumentar el riesgo de SHO por un lado ni el de cancelación del ciclo por falta de respuesta por otro (Fauser et al., 2008).

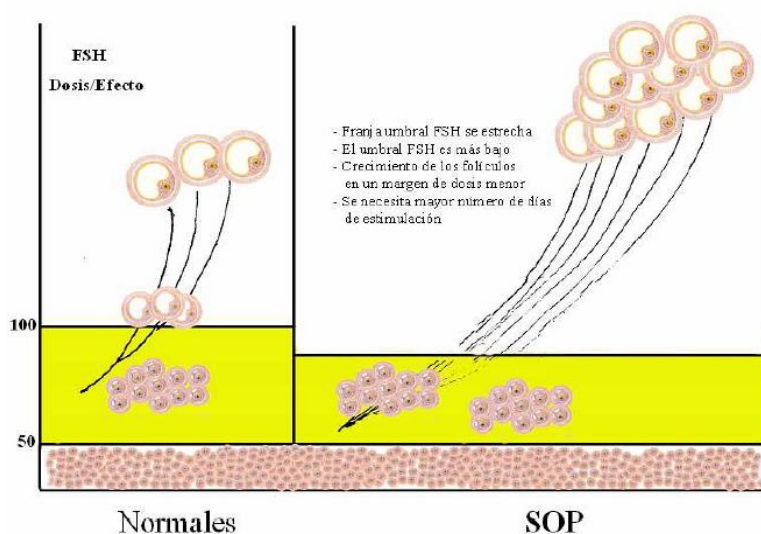
Ya vimos anteriormente que existen una serie de factores predictivos de la respuesta ovárica como son la edad de la paciente, el estado hormonal, la causa de esterilidad, el RFA, la respuesta en ciclos anteriores y el IMC entre otros. La consideración más importante es que el tratamiento debe ser personalizado, aunque en general nos enfrentaremos a tres tipos de respuesta: normal, baja y alta (SOP ecográfico y SOP síndrome en esta última) (Fauser et al., 2008).

En la figura 12 observamos cómo hacia el día 6 del ciclo la concentración de FSH es máxima y hacia el día 7 tiende a bajar su nivel y subir el estradiol ya que el folículo seleccionado inicia la dominancia y el resto de folículos son conducidos a la atresia. De aquí deriva el concepto de ventana de FSH, definida como el periodo de descenso de la FSH hasta la ovulación y, es precisamente esta ventana, la que debemos mantener abierta con la administración de FSH para evitar la atresia y lograr así un desarrollo folicular múltiple.



**Figura 12.** Ciclo menstrual hormonal.

Existe también el concepto de dosis umbral de FSH definido como la dosis más baja a la cual una mujer debería responder con un desarrollo monofolicular. Cada folículo tiene su propio umbral siendo su sensibilidad a la FSH progresiva durante el ciclo y la dosis umbral permanece estable en cada paciente. Variaciones en la dosis diaria de FSH de un 30% puede inducir a un desarrollo multifolicular y con la edad el umbral también aumenta. La dosis umbral hay que tenerla muy en cuenta en el SOP (Fig.13), donde se estrecha la franja del umbral, la dosis umbral es más baja, el reclutamiento folicular aumenta con un margen de dosis menor y son necesarios más días de estimulación.



**Figura 13.** Dosis umbral de la FSH.

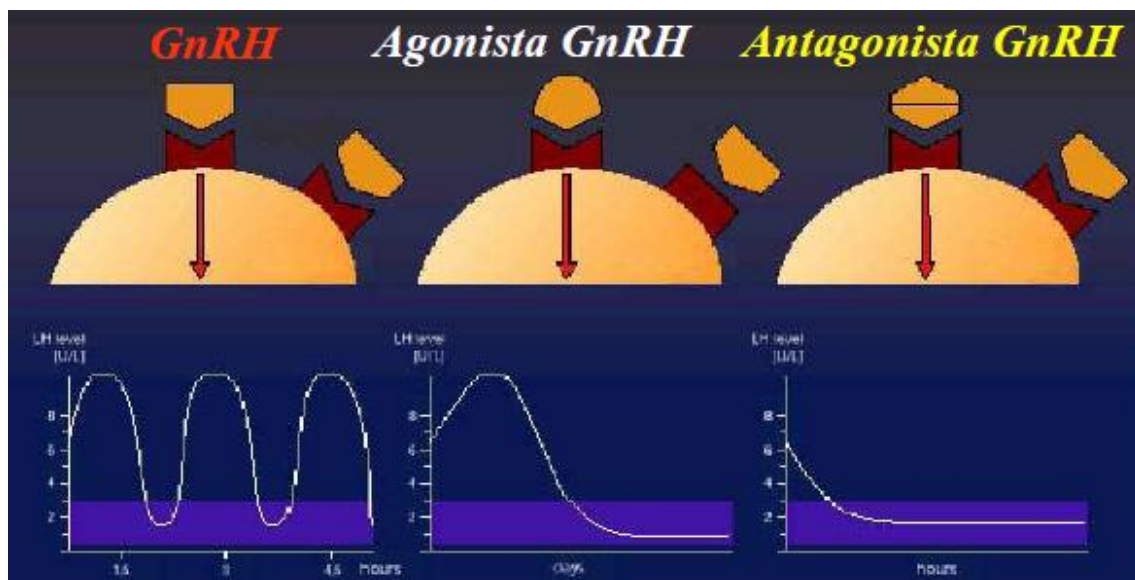
Los preparados disponibles actualmente para realizar un ciclo de estimulación ovárica farmacológica para desarrollo folicular se resumen en los siguientes principios activos:

- Citrato de clomifeno.
- Gonadotropinas:
  - FSH-u.
  - FSH-r alfa y beta.
  - hMG.
  - hMG-up.
  - LH-r.
  - hCG-r.
  - FSH-r/LH-r (2/1).
  - Corifolitropina alfa.
  - Biosimilares de FSH.
- Inhibidores de la aromatasas: letrozol.
- Agonistas de GnRH: leuprorelina, triptorelina, nafarelina.
- Antagonistas de Gn-RH: cetrorelix y ganirelix.
- Otros: progesterona, estradiol, metformina, inositol, testosterona, etc.

Existen innumerables trabajos y controversias acerca de cuál sería el protocolo ideal de HEOC con mejores resultados. En cualquier protocolo es preciso clasificar a la paciente según tipo de respuesta, seleccionar el tipo de ciclo (largo vs corto), la dosis de inicio, el tipo de gonadotropina y la adición o no de aLH, si es necesario el uso de coadyuvantes y tener en cuenta además una serie de medidas generales.

El tipo de ciclo largo o corto se caracteriza por el momento en que se inicia de la supresión hipofisaria. En 1977 el descubrimiento del decapeptido GnRH por *Andrew Schally* y *Roger Guillemin* abrieron el camino de la HEOC con desarrollo folicular múltiple al evitarse con sus derivados el pico prematuro de LH. La GnRH se libera de forma pulsátil desde el hipotálamo uniéndose a receptores específicos de las células gonadotropas de la adenohipófisis donde controla la secreción de FSH y LH jugando así un papel esencial en la función reproductiva de la mujer.

En la figura 14, se puede observar el mecanismo de acción de los análogos o agonistas y los antagonistas de la GnRH. Los análogos debido a los cambios realizados en la molécula original de GnRH poseen una vida media más prolongada, mayor afinidad por el receptor y en una primera fase de 3 días de duración tienen efecto estimulador de FSH y estradiol conocido como “*flare-up*” para posteriormente en 7-10 días producir una desensibilización hipofisaria conocida como “*down regulation*”. Los antagonistas de la GnRH se diferencian de los agonistas en que su efecto es dosis dependiente produciéndose rápidamente mediante inhibición competitiva reversible con la GnRH evitándose así el “*flare-up*”.



**Figura 14.** Mecanismo de acción de agonistas y antagonistas de la GnRH.

El **protocolo largo** se inicia el día 20-22 del ciclo previo al de la HEOC (mitad de fase lútea), bajando la dosis a la mitad el día del inicio de la HEOC con algunas ventajas respecto al corto con antagonistas o análogos como son la mejora de la efectividad de la estimulación en la FIV (desarrollo folicular múltiple), reducción de cancelación de ciclos por prevenir el pico espontáneo de LH, incremento del número de ovocitos obtenidos, incremento de la tasa de madurez ovocitaria, incremento del número de embriones, tendencia a mejorar las tasas de gestación (no significativa), mejor sincronización y programación entre los procesos clínicos y de laboratorio (Fig. 15) (Al-Inany et al., 2011).

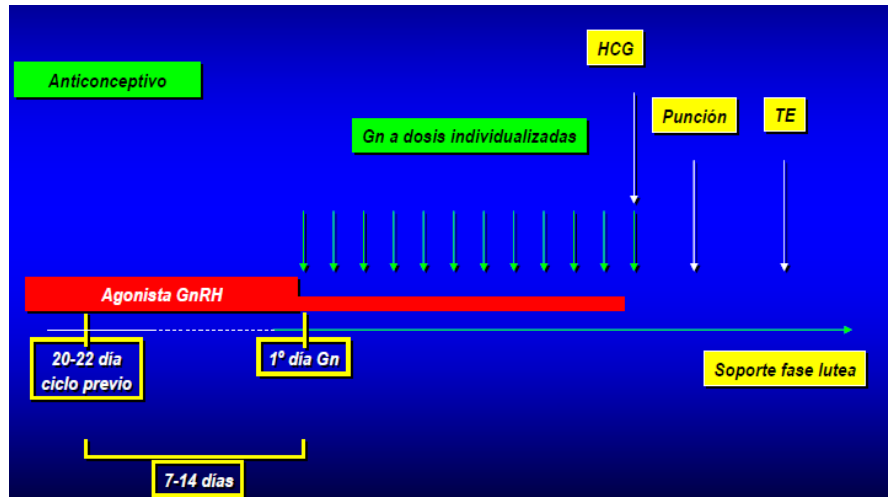


Figura 15. Protocolo largo con agonistas de GnRH (Al-Inany et al., 2011).

En el *protocolo corto con antagonistas* la HEOC se inicia el 2º ó 3º día del ciclo y puede ir o no precedido de anticonceptivos entre 12 y 21 días, bien para mejor programación o bien para mejorar la sincronía del desarrollo folicular múltiple. Existen 2 modalidades de antagonistas, la fija con dosis única de cetrorelix 3 mg o diaria de cetrorelix o ganirelix 0,25 mg desde el 6º día del ciclo hasta 0-24 horas de la administración de la hCG y la flexible con dosis diarias de 0,25 mg diarios de antagonista hasta 0-24 horas de la hCG (Fig. 16) (Albano et al., 2000; Borm et al., 2000).

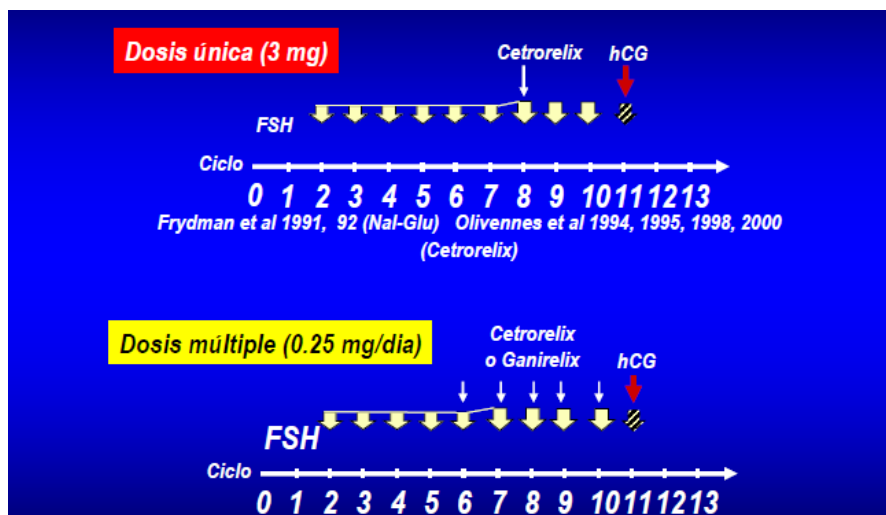


Figura 16. Protocolos con antagonistas de la GnRH (Albano et al., 2000; Borm et al., 2000).

Aunque no existen diferencias significativas en cuanto a tasas de gestación y RN vivo entre el protocolo corto con antagonistas y el largo con agonistas, se ha comprobado en 5 ensayos clínicos cierta tendencia favorable hacia el protocolo largo (Al-Inany et al., 2002). En la tabla 9 podemos observar las principales diferencias clínicas terapéuticas entre análogos y antagonistas de la GnRH (Tarlatzis et al., 2007).

**Tabla 9.** Diferencias clínicas terapéuticas entre análogos y antagonistas de la GnRH (Tarlatzis et al., 2007)

	Antagonista	Agonista
Depleción de gonadotropinas endógenas	No	Sí
Rapidez de acción	Horas	7-10 días
Efecto flare-up	No	Sí
Riesgo formación quistes	No	Sí
Hipoestrogenismo marcado	No	Sí
Adm. inadvertida durante gestación	No	Posible
Necesidades de gonadotropinas	Menores	Mayores
Duración del tratamiento	Menor	Mayor
Experiencia clínica	Desarrollada	Desarrollada
Desencadenamiento de la ovulación	hCG-r y/o análogo	hCG-r siempre
Facilidad de programación	Menor (sin AH*)	Mayor (p. largo)
Eficacia terapéutica (gestación clínica)	Menor	Mayor

\*AH: anticonceptivo hormonal

**Tabla 10.** Protocolos más usuales de estimulación ovárica (Humaidan; Marrs; Mochtar; Balasch)

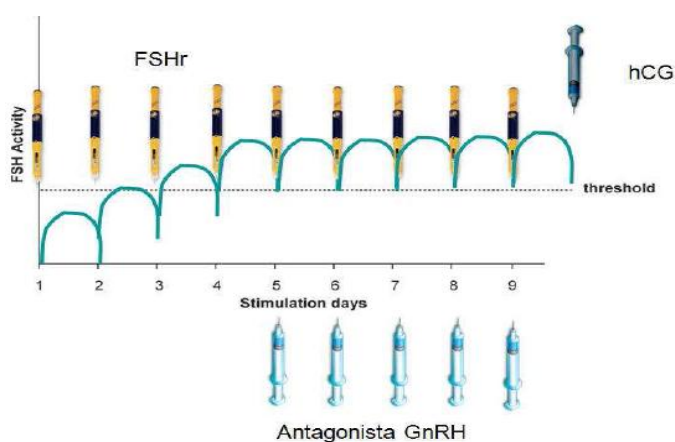
\*aLH: acción de hormona luteinizante

Tipo de Mujer	Ciclo	Dosis inicio (FSH)	Tipo medicación	Duración FSH (días)
Normo-respuesta	Corto + Antag	150-300	FSH-r sola ó aLH*	9,5 ± 1
	Largo	+/- 75 -150		
SOP Síndrome	Largo	100-200	FSH-r sola	Mínimo 10
	Corto + Antag	ó 100-150	NO aLH	NO Coasting
SOP ecográfico	Largo	75-150	FSH-r sola	Mínimo 10
	Corto + Antag	ó 75-100	NO aLH	NO Coasting
Baja Respuesta	Corto + Antag. Corto "flare up" ± Clomifeno	300-450 + 75-225	FSH-r + aLH	>12 Mal pronóstico

\*aLH: acción de hormona luteinizante.

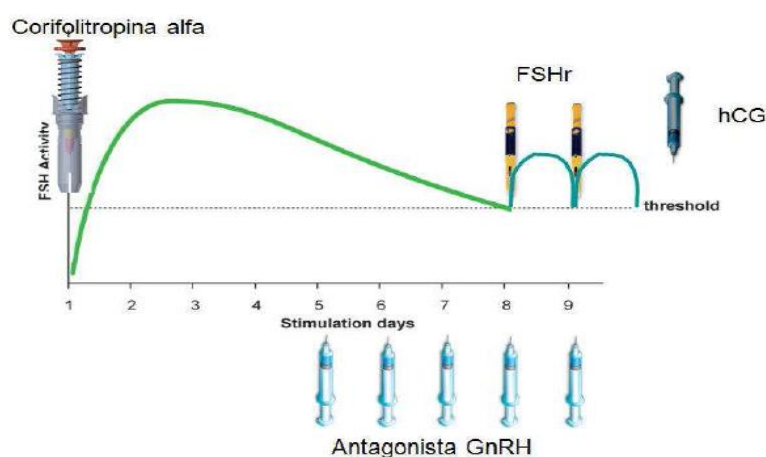
En la tabla 10 podemos observar los protocolos de HEOC más usuales. La acción LH (aLH) viene determinada por LH-r o hMG y se suele utilizar asociada a la FSH en pacientes mayores de 35 años y bajas respondedoras con mejores resultados (Humaidan et al., 2005; Marrs et al., 2004; Mochtar et al., 2007). Al igual que la FSH, la LH tiene una ventana terapéutica y un umbral, además de un techo. La ventana se encuentra entre 1,2 y 3 UI/L donde la LH es beneficiosa propiciando un normal crecimiento y desarrollo folicular, una normal síntesis de andrógenos y estrógenos y una normal maduración del ovocito. Por encima del techo de 3 UI/L, la LH tiene efectos negativos provocando la supresión de la proliferación de las células de la granulosa, atresia folicular de los folículos no dominantes, supresión de la actividad aromataasa, luteinización prematura y mala calidad ovocitaria. Por debajo del umbral de 1,2 UI/L se producirá un crecimiento folicular inadecuado, una inadecuada síntesis de andrógenos y estrógenos y una maduración incompleta del ovocito (Balasch et al., 2002).

El 1 de abril de 2011 se introdujo en España la *corifolitropina alfa* con las presentaciones de 150 y 100 µg para pacientes de más o menos de 45 Kg respectivamente. Como observamos en la figura 18, la ventaja principal es la acción prolongada siendo el efecto máximo al 3º día de su administración y va bajando lentamente hasta llegar al umbral de FSH hacia el 8º día donde se precisa ajustar con dosis diarias de FSH con o sin aLH hasta la administración de la hCG. Si la comparamos con la pauta estándar de dosis diaria de FSH (Fig.18), la única ventaja es la comodidad para la paciente, no ofreciendo diferencias significativas en cuanto a resultados con otros protocolos (Duijkers et al., 2002; Fauser et al., 2009).



**Figura 17.** Esquema terapéutico de protocolo corto con antagonistas a dosis fija diaria.





**Figura 18.** Esquema terapéutico de protocolo corto con antagonistas a dosis fija diaria y dosis única de corifolitropina alfa, completando el ciclo con dosis diaria de FSH-r.

También podemos utilizar distintos fármacos coadyuvantes asociados a las gonadotropinas, como la metformina en el SOP para sensibilizar el ovario de estas pacientes a la acción de la FSH (Or et al., 2006) y el citrato de clomifeno como potenciador de la acción de las gonadotropinas en la baja respuesta con la intención de reclutar un mayor número de folículos (Saadat et al., 2003). Finalmente, el letrozol se suele utilizar en los protocolos de estimulación de pacientes oncológicas con tumores estrogénodpendientes (Checa-Vizcaíno et al., 2012; Oktay et al., 2015).

## 1.8. METODOLOGÍA DE LABORATORIO DE FIV/ICSI

### ➤ Consideraciones generales

Un laboratorio de FIV/ICSI precisa de una situación, una distribución, unos medios físicos y unos medios humanos con el fin de llevar a cabo unos procedimientos determinados.

El laboratorio puede estar ubicado en un centro hospitalario o en una clínica de reproducción asistida, en ambos casos debe existir un aislamiento mediante un sistema de filtros y una presión positiva. Las condiciones ambientales deben ser muy estrictas ya que hay que proteger el laboratorio de contaminantes como el dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre, hidrocarburos derivados del petróleo, tolueno, benceno, etc., denominados compuestos orgánicos volátiles (COV). La eliminación de estos contaminantes se realiza a



través de torres de filtración de carbón activado o permanganato potásico (filtros HEPA) y se pueden instalar en el mismo laboratorio, en los incubadores y en el sistema de suministro de CO<sub>2</sub>. Los COV deben ser analizados periódicamente (Khoudja et al., 2013).

Para evitar traslados de ovocitos y embriones y minimizar los posibles cambios en los medios de cultivo debido a la distancia, el laboratorio de reproducción debe estar situado lo más próximo posible al quirófano y, a ser posible, comunicado a través de una ventana.

En cuanto a la distribución de los espacios del laboratorio de reproducción deben estar separados físicamente en área de embriología donde se manipulan y cultivan ovocitos y embriones, área de andrología donde se tratan las muestras de semen y área de congelación y descongelación donde se almacenan los contenedores de nitrógeno líquido con los embriones y gametos criopreservados. Con esta distribución se trata de evitar posibles contaminaciones (Magli et al., 2008).

Los medios físicos se componen de un aparataje, material fungible y medios de cultivo. Los medios humanos serán los embriólogos encargados de la estandarización de las técnicas de laboratorio, registro informático de los procesos, registro manual, infraestructura de pedidos, control de niveles, etc.

Entre los medios físicos estables se encuentran las cabinas de flujo laminar (estaciones de trabajo con uno o dos puestos), superficies calefactadas, lupas binoculares, microscopios invertidos, micromanipulador, centrífugas, selladoras de pajuelas, congelador (no necesario si se vitrifica), contenedores de nitrógeno líquido, pipetas de manipulación, micropipetas de ICSI y de biopsia embrionaria, cámara de conteo espermático y frigorífico.

Los medios de cultivo son específicos y distintos para la punción folicular, para cultivo propiamente dicho, para la ICSI, para congelación o vitrificación y para descongelación o desvitrificación. Existen unas condiciones de cultivo donde hay que controlar la temperatura, el nivel de CO<sub>2</sub>, la humedad y la oscuridad.

El material fungible en general consta de tubos estériles de base redonda y cónica, placas de Petri, placas de cultivo, puntas de pipetas y micropipetas, pajuelas de congelación o vitrificación, catéteres de transferencia e inseminación, jeringas de 1 mL, agujas, hojas de bisturí y contenedores de material punzante de desecho.

Todo el material empleado debe ser controlado de forma estricta, para ello lo ideal sería utilizar material embriotestado y además, la casa comercial suministradora debe ofrecer las máximas garantías y acreditación oportuna. Es necesario realizar controles periódicos de los incubadores testando los niveles de CO<sub>2</sub>, el pH y la temperatura. El suministro del CO<sub>2</sub> a los incubadores debe ser filtrado para evitar contaminaciones como hemos apuntado anteriormente. La limpieza del laboratorio es muy importante que se realice con productos que no sean tóxicos y hay que esterilizar los componentes de los equipos que lo precisen (Hughes et al., 2012).

Las condiciones de cultivo precisan de una estabilización máxima de la temperatura manteniéndola a 37°C de forma constante mediante el empleo de placas calefactadas, minimizando los tiempos de manipulación del proceso, controlando los incubadores y empleando aceite mineral que además de amortiguar los cambios de temperatura actúa de barrera frente a agentes contaminantes químicos y biológicos.

La ASEBIR establece una serie de recomendaciones para optimizar los resultados como son la presencia de un embriólogo por cada 100-150 punciones; una estación de trabajo, incubador (máximo 3 pacientes por cada uno) y microinyector por cada 100 punciones; y tener en cuenta que los procesos llevados a cabo en el laboratorio son dinámicos, un retraso en la evaluación de cada etapa puede dar lugar a una mala interpretación, cuyas consecuencias pueden ser terribles.

Los medios humanos también deben ser controlados con acceso restringido al personal ajeno al laboratorio, con lo que se minimizará el riesgo de contaminaciones y accidentes con el manejo de placas. El lavado sistemático de manos, el empleo continuado de gorro y mascarilla y el uso de indumentaria y calzado específico será obligatorio. Entre las condiciones de trabajo del personal se encuentra la mentalización de la importancia de cada proceso, la máxima concentración en el manejo de las muestras, la verificación, a ser posible, por más de una persona en cada proceso y la identificación correcta de las y los pacientes.

Es de suma importancia que exista unificación de criterios en todos los pasos, es decir, en las punciones foliculares, en la capacitación espermática, en la FIV/ICSI, en la evaluación de los signos de fecundación, en la evaluación de la calidad embrionaria, en la transferencia embrionaria, en la congelación - descongelación y en los tiempos de manipulación.

Todos los procesos deben quedar registrados en la hoja de laboratorio con los datos imprescindibles que son el nombre, la fecha, el número de registro del ciclo, el diagnóstico de esterilidad, el número de orden del ciclo, el ginecólogo, el embriólogo, el número de ovocitos, características del semen, técnica a realizar, evolución de cada etapa, transferencia, características de los embriones, destino de los mismos, datos de la estimulación ovárica, incidencias, fin del ciclo y resultado del mismo. Los datos recogidos manualmente serán registrados en un soporte informático para su posterior procesamiento. En caso de congelar embriones y gametos cada caso tendrá un código de congelación y, al utilizarlos, hay que registrar de forma muy precisa lo que se descongela y lo que queda criopreservado en sus contenedores oportunos (Hughes et al., 2012).

Para el control de calidad de la unidad es preciso realizar un análisis estadístico de los resultados globales del equipo, además de los resultados individuales de ginecólogos y embriólogos. La tasa de implantación embrionaria, medida por el análisis de la  $\beta$ -hCG en suero de la paciente, es un excelente indicador para evaluar la calidad de cada centro (Hughes et al., 2012).

➤ Punción ovárica folicular

A las 34-36 horas de la administración de la hCG-r se procede a la punción ovárica folicular (POF) transvaginal ecoguiada en el quirófano de reproducción asistida. La anestesia puede ser local paracervical con lidocaína al 2% infiltrando 10 mL en cada fondo de saco vaginal lateral o general, mediante sedación, usualmente realizada con propofol. La punción folicular se realiza generalmente con aguja de 17G y 33 cm de longitud, que es introducida a través de una guía conectada a una sonda transvaginal de un ecógrafo, con una conexión a un tubo Falcon®, que sirve de colector del líquido folicular, el cual se va extrayendo de cada folículo puncionado gracias a un aspirador de ovocitos, así, el ginecólogo con una mano dirige la sonda transvaginal, con la otra mano dirige la aguja de punción y con un pedal controla el aspirador, mientras que la enfermera va recolectando los tubos con el líquido folicular en tubos, previamente calefactados, que a su vez va entregando al personal del laboratorio para la inmediata identificación y aislamiento de los cúmulos ovígeros. El examen de los líquidos obtenidos se realiza en placas de Petri, previamente calefactadas a 37°C, con lupa binocular instalada en la campana de flujo laminar y en oscuridad. Una vez recuperados los cúmulos ovígeros, el embriólogo procede a la separación y lavado de los mismos para eliminar restos hemáticos y de líquido folicular a la vez que los

va clasificando por estadio de madurez según sus características morfológicas externas. El paso anterior se realiza en placas de lavado con medios a 37°C que no alteren su pH y cubierto con aceite mineral para mantener la temperatura constante y proteger al ovocito de posibles contaminantes. Cada laboratorio usa distintos tipos de placa para la puesta en cultivo de los ovocitos viables siendo aconsejable realizarlo en microgota con 20 µL de medio de cultivo, lo cual permite el seguimiento individual de cada uno de ellos. La placa de cultivo con los ovocitos en su interior se introduce en el incubador a 37°C, 5-6% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

➤ Procedimientos de laboratorio

▪ **Capacitación espermática**

Existen diversas técnicas para capacitar el esperma que dependen de la calidad de la muestra, de la procedencia de la misma y de la técnica final a realizar. El principio básico es lograr aislar los espermatozoides con mayor motilidad y mejor morfología eliminando el plasma seminal, espermatozoides muertos y células inmaduras. Las 2 técnicas de capacitación espermática más utilizadas son la de gradientes de densidad y la de “swim-up”.

El “*swim-up*” es la técnica normalmente empleada para la preparación de las muestras cuyo destino son inseminaciones, estudio previo del varón o ICSI. El primer paso consiste en hacer una dilución de semen en un volumen igual de medio de lavado. Se mezcla bien y se centrifuga a 2000-2500 rpm durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y se añade al sedimento 0,3-0,4 mL de medio de cultivo. Se deja en tubo Falcon® con fondo redondo en posición inclinada para aumentar la superficie de contacto del semen con el medio durante 1 hora a 37°C y 5-6% de CO<sub>2</sub> en el incubador. Finalmente se aspira la fracción superior que es donde se encuentran los espermatozoides móviles recuperados y se realiza el recuento de los mismos (*REM*) (Bellis et al., 1990).

La técnica de ***gradientes de densidad*** es la que se emplea normalmente para la FIV. Se utilizan gradientes de distintas fracciones de Puresperm® (45-90) en tubos Falcon® de fondo cónico. El primer gradiente es de alta densidad, luego va el de baja densidad y por último 1 mL de la muestra de semen. A continuación, se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos, se recoge con una pipeta el denominado “pellet” que no es más que sedimento del fondo del tubo (0,1 mL) donde se encuentra la muestra de espermatozoides de mayor movilidad seleccionada por gradientes de densidad, la cual se traspara a un tubo

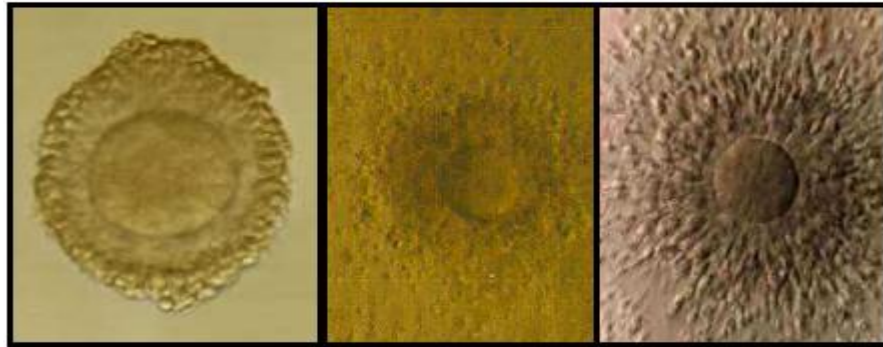
limpio con medio de lavado y se vuelve a centrifugar a 2000-2500 rpm durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se vuelve a suspender la muestra en 1 mL de medio de cultivo limpio para realizar inmediatamente la tercera y última centrifugación a 2000-2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 0,3 mL de medio de cultivo ajustando el volumen de inseminación al recuento de espermatozoides móviles recuperados (*REM*) (Mortimer, 2000).

El REM nos orienta a la hora de decidir la TRA, así, si el  $REM > 5 \times 10^6/\text{mL}$  ( $> 3\%$  de formas normales) estaría indicada la IIU siempre que al menos una trompa de Falopio sea permeable, la edad de la paciente sea menor de 38 años y el tiempo de evolución de la esterilidad sea menor de 5 años. Si el REM se sitúa entre  $3-5 \times 10^6/\text{mL}$  ( $> 3\%$  de formas normales) se podría realizar FIV clásica o mixta si se trata de EOD o fracaso de IIU para intentar asegurar la fecundación. Por último, se realizará ICSI si el  $REM < 3 \times 10^6/\text{mL}$  y/o existiese teratozoospermia (Guía de Reproducción Humana Asistida en el Sistema Sanitario Público de Andalucía, 2015).

#### ▪ Evaluación de la madurez y morfología ovocitaria

De entrada, se realiza una valoración indirecta del estadio de madurez nuclear ovocitaria, la cual se basa en el aspecto morfológico del complejo cúmulo-corona-ovocito, aunque no siempre existe correlación entre estas dos variables. Si es posible realizar FIV, los ovocitos MI también deben ser inseminados, ya que puede existir maduración in vitro de los mismos. La maduración nuclear del ovocito se produce al completarse la metafase de la segunda división meiótica con la eliminación del primer corpúsculo polar. La maduración citoplasmática ovocitaria se completa con la adquisición de los factores necesarios que harán posible la fecundación y el desarrollo embrionario.

En la figura 19 se puede observar la clasificación morfológica indirecta de los ovocitos en sus distintos estadios madurativos. La vesícula germinal (VG) se caracteriza por tener tanto el cúmulo como la corona radiata muy compactos y una coloración ámbar. El ovocito en metafase I (MI) posee un cúmulo en estado intermedio y la corona radiata aún no llega a adoptar su forma radial. El ovocito en metafase II (MII) presenta un cúmulo expandido y filante, con una corona de células en disposición radial y laxa.



**Figura 19.** Estadios de madurez ovocitaria originales. De izquierda a derecha: VG, MI, MII.

En las figura 20 se pueden observar, una vez decumulados los ovocitos, la correspondencia del aspecto externo con la madurez nuclear. El ovocito en VG se encuentra en la profase I de la meiosis y se caracteriza por presentar un núcleo prominente, permaneciendo con la meiosis detenida en dictiotene gracias al AMPc y otros factores (Katab et al., 1991; Mattioli et al., 1994). El ovocito MI ya no presenta membrana nuclear, posee un ooplasma homogéneo y se caracteriza por no visualizarse el primer corpúsculo polar. El ovocito MII o maduro posee una zona pelúcida intacta, un oolema íntegro, un ooplasma homogéneo sin membrana nuclear y un espacio perivitelino con un corpúsculo polar (Moor et al., 1998; Picton et al., 1998).



**Figura 20.** Estadios de madurez ovocitaria decumulados. De izquierda a derecha: VG, MI, MII.

Es preciso realizar la valoración morfológica de los ovocitos tras su decumulación, como son alteraciones a nivel del ooplasma o citoplasma, integridad de las estructuras ovocitarias, el corpúsculo polar, la zona pelúcida, el espacio perivitelino y la existencia de cúmulos vacíos. El corpúsculo polar puede presentar diversas alteraciones morfológicas como aparecer en “boina”, fragmentado o atrofiado, lo cual no afecta ni la calidad embrionaria ni la tasa de gestación (Ciotti et al., 2004). La zona pelúcida normalmente mide 15-20 micras, pero puede presentar alteraciones en grosor (ancha o estrecha), aparecer elongada y también irregular. El espacio perivitelino normal es excéntrico, a modo de luna en cuarto creciente, presenta un contenido limpio y da cabida al corpúsculo polar, pero puede presentar alteraciones, como aparecer tabicado o aumentado de tamaño, disposición irregular y contener fragmentos en su interior. Por último, pueden existir alteraciones ovocitarias a nivel del ooplasma como la presencia de vacuolas, acumulaciones de retículo endoplásmico liso (*AREL*), cuerpos de inclusión (necróticos, refringentes y picnóticos), ooplasma granuloso y ooplasma contraído. Se estima que hasta un 60-70% de los ovocitos recuperados tras un ciclo de estimulación ovárica pueden presentar alguna anomalía morfológica (Rienzi et al., 2012).

#### ▪ Procedimiento de la FIV clásica

En los casos indicados se prepara la muestra de semen por la técnica más adecuada a sus características. Una vez ajustado el volumen final de inseminación según el tipo de técnica de cultivo empleada, se utilizan 20.000 espermatozoides / mL para cultivo en microgota de 20  $\mu$ L o 100.000 espermatozoides / mL en pocillo de 1 mL. Por lo tanto, para realizar un correcto cultivo en FIV es necesario controlar una serie de parámetros como el volumen ajustado a la concentración de espermatozoides para inseminar los ovocitos como hemos expresado, además, el tiempo transcurrido desde la punción ovárica folicular debe ser de 1 a 4 horas. Posteriormente, se deposita la placa con los ovocitos inseminados en el incubador durante 17-20 horas, a 37°C y 5-6% de concentración de CO<sub>2</sub> (% variable según los medios de cultivo empleados). Es importante no superar el tiempo de exposición de los ovocitos a los espermatozoides debido a la liberación de enzimas de estos últimos, que podrían alterar el metabolismo ovocitario. La fecundación se visualiza en este intervalo de tiempo con la aparición de 2 pronúcleos y la expulsión del segundo corpúsculo polar. Por otro lado, el mal ajuste de la concentración de espermatozoides para inseminar los ovocitos puede conllevar fallos de fecundación o elevado porcentaje de polipenetración (Ballantyne, 2008).



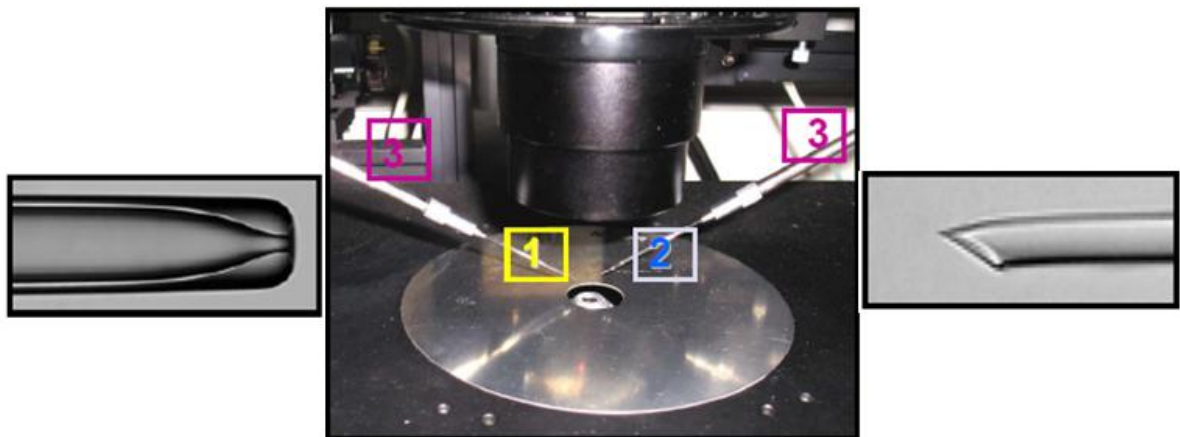
## ▪ Procedimiento de la ICSI

La inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (*ICSI*) precisa de un micromanipulador acoplado a un microscopio invertido instalado en una mesa antivibratoria. El micromanipulador está adaptado para realizar movimientos en los 3 ejes del espacio y consta de un sistema de microaspiración, una superficie calefactada, un sistema de ópticas invertidas con aumentos 4X, 10X, 20X y 40X, un sistema de filtros anticalóricos y un sistema de óptica Hoffman (Fig. 21). El sistema de microaspiración, a su vez, se compone de una micropipeta desechable de sujeción (holding 1), una micropipeta desechable de inyección (ICSI 2), un sistema de lápices para adaptar las micropipetas (3) y un circuito relleno de aceite para transmitir el movimiento de aspiración / liberación a las micropipetas a través de los lápices (Figs. 21 y 22). Los movimientos del micromanipulador se controlan mediante un dispositivo con 3 mandos que permiten realizar los movimientos del eje X (derecha-izquierda), del eje Y (arriba-abajo) y del eje Z (detrás-delante). Los microinyectores controlan la micropipeta Holding para sujetar al ovocito y la de ICSI para inyectar el espermatozoide. Antes de proceder a la microinyección es necesario ajustar los mandos del micromanipulador poniendo todos los sistemas que nos permiten el movimiento en los 3 ejes del espacio a la mitad, así se permitirá mayor libertad en los desplazamientos de las micropipetas, también hay que purgar los circuitos de aceite para evitar la formación de burbujas de aire que pueden distorsionar y descontrolar la aspiración / expulsión de los gametos en sus respectivas micropipetas, tampoco hay que olvidar conectar la placa térmica para que en el momento de la microinyección la temperatura se encuentre a 37°C y, por último, limpiar la superficie y las partes superiores del microscopio para evitar la posible caída de polvo sobre la placa de microinyección. Las micropipetas Holding y de ICSI deben quedar correctamente enfrentadas y enfocadas (Palermo et al., 1992).





**Figura 21.** Micromanipulador para ICSI.



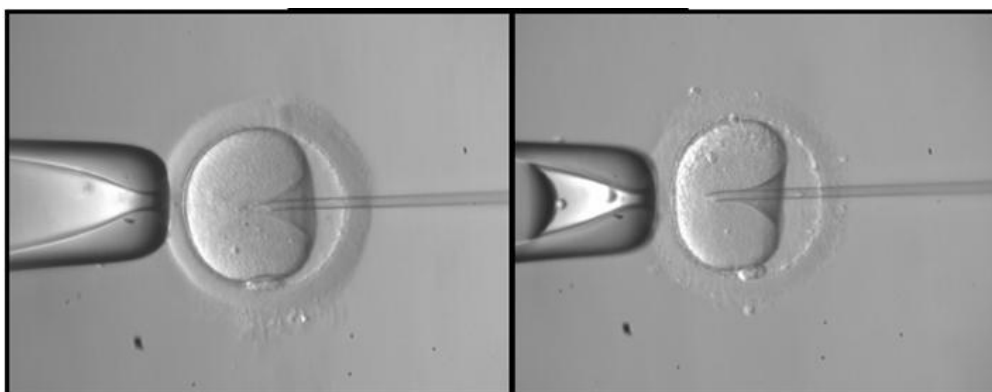
**Figura 22.** Sistema de lápices con puntas de micropipetas Holding (izquierda) e ICSI (derecha).

A las 2-4 horas de la POF se procede a la decumulación de los ovocitos, para lo cual se requiere una placa de decumulación, que contiene hialuronidasa por un lado y medio de lavado por otro. Este paso se realiza con micropipeta de decumulación con punta de 130 micras, dentro de la campana de flujo laminar a 37°C y con visión a través de lupa

binocular, donde se van exponiendo los cúmulos ovígeros a la hialuronidasa, se van lavando y se van separando del ovocito las células del cúmulo y la corona radiata por acción mecánica de fricción con la micropipeta. Una vez denudados los ovocitos, ya se puede realizar la evaluación de la madurez nuclear y morfológica para seleccionar los MII que serán microinyectados (Palermo et al., 1992).

A las 4-6 horas de la POF se procede a la ICSI propiamente dicha, para lo cual se requiere la preparación de una placa de ICSI en la que se depositan gotas con PVP donde se introducen los espermatozoides capacitados para que disminuya su movilidad y así poder manipularlos, otras microgotas de 5  $\mu$ L de medio de cultivo tamponado en el centro de la placa donde se depositan los ovocitos decumulados en cada una y, por último, unas gotas con medio de lavado cubriendo toda la superficie de la placa con aceite mineral. Posteriormente, se seleccionan los espermatozoides con mejor morfología y se inmovilizan mediante una presión mecánica ejercida con la micropipeta de ICSI sobre su cola, lo cual produce una modificación de su membrana similar a la reacción acrosómica, la cual les confiere capacidad fecundante. Una vez inmovilizado el espermatozoide y con el ovocito sujeto con la micropipeta Holding con el CP, orientado a las 6 o a las 12 horarias, para intentar no dañar el huso meiótico durante el proceso, se microaspira por el flagelo dicho espermatozoide con la micropipeta de ICSI, se coloca en la punta, se microinyecta dentro del ooplasma aspirando una pequeña cantidad de citoplasma para asegurarse de la rotura del oolema y, por último, se libera el espermatozoide en el interior del ooplasma y se suelta el ovocito de la micropipeta Holding (Fig. 23). Finalizada la ICSI de todos los ovocitos, se lavan cuidadosamente pasándolos por medios de cultivo basados en el fluido tubárico (HTF) para que desaparezca la sustancia tampón (HEPES). Será entonces cuando se pasan a la placa de cultivo en microgota o pocillo y se introducen en el incubador durante 15-20 horas hasta evaluar la fecundación (Ebner et al., 2002; Rienzi et al., 2001).

La ICSI está indicada cuando existe factor masculino grave, factor inmunológico (anticuerpos antiespermatozoides), fallos previos de FIV, DGP, baja respuesta, mala calidad ovocitaria y ovocitos desvitrificados.



**Figura 23.** Microinyección espermática intracitoplasmática en ovocito MII.

#### ▪ **Evaluación de la fecundación: formación del cigoto**

Los signos de fecundación correcta del ovocito son la extrusión del segundo CP, la formación del pronúcleo (*PN*) *femenino*, la descondensación de la cabeza del espermatozoide y la posterior formación del *PN masculino*. En la mayoría de los ovocitos los PN son visibles a las 17-22 de su inseminación en la FIV y a las 15-20 horas en la ICSI. La presencia de 2 PN no es evidencia absoluta de fecundación normal, ya que no podemos asegurar el origen de cada uno de ellos. La observación de los PN debe realizarse directamente en el microscopio invertido. La presencia del segundo CP puede ser el resultado de la fragmentación del primero, por lo que hay que tener cuidado a la hora de evaluar la fecundación. Si los cigotos proceden de FIV, se hace necesario decumularlos previamente para poder observarlos correctamente.

Existen unos criterios para la clasificación morfológica de los **zigotos** basados en el tamaño, posición y número de los PN y de los nucléolos. Así, los mejores cigotos serán los que posean los PN más próximos entre sí, los más centrados en el ooplasma, los de tamaño más parejo, los que tengan de número 2 PN y los que presenten igual número de cuerpos precursores nucleolares lo más polarizados posible hacia la zona de yuxtaposición. Estas características permitirán un mejor proceso de *singamia* para generar los embriones de mejor calidad a la hora de seleccionarlos para ser transferidos al útero de la paciente (Fig. 24). Embriones procedentes de cigotos con PN de distinto tamaño se ha relacionado con mayor tasa de bloqueo o parada evolutiva, mayor tasa de multinucleación y mayor porcentaje de anomalías cromosómicas.



**Figura 24.** Zigoto de calidad A.

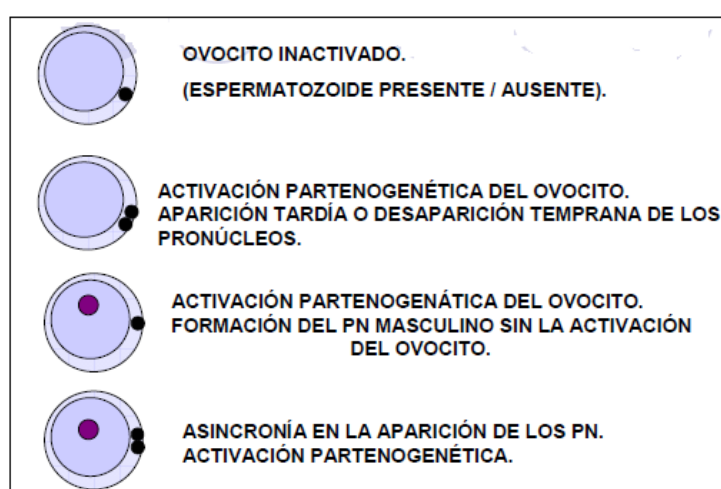
La fecundación tras la FIV/ICSI puede realizarse de forma anómala, con lo cual al observar el número de PN nos encontraremos con ninguno, 1, 3 ó más de 3 (Fig. 25). Así, en función del número de PN y CP nos podremos encontrar 1 CP con ningún PN, estando o no presente el espermatozoide, lo cual indica que el ovocito permanece inactivado, ya que no existe fecundación.

Por otro lado, puede suceder también la activación partenogenética del ovocito, la cual puede presentarse de distintas formas, tales como la presencia de 2 CP y ningún PN, por aparición tardía o temprana de los mismos; 1 CP y 1 PN, lo que indica la formación del PN masculino sin la activación del ovocito; por último, 2 CP y 1 PN, que manifiesta una asincronía en la aparición de los PN (Fig. 26).

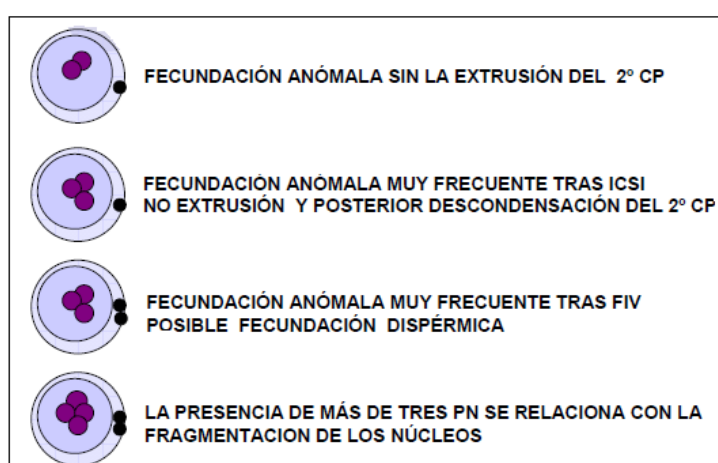
También puede presentarse el caso de 2 PN sin la extrusión del segundo CP en zigotos digénicos, si no ha habido fecundación, o bien, producirse la posterior descondensación del mismo CP dentro del oolema, dando aspecto de zigoto con 3 PN y 1 CP, si existió fecundación, hecho muy frecuente en ICSI. Si nos encontramos con 3 PN y 2 CP, debemos pensar en una posible fecundación diespérmica, hecho muy frecuente en FIV clásica. La presencia de más de 3 PN se relaciona con la fragmentación de los núcleos (Fig. 27) (Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos, 3ª edición, 2015).



**Figura 25.** Zigotos anómalos con 1, 3 y 4 PN.



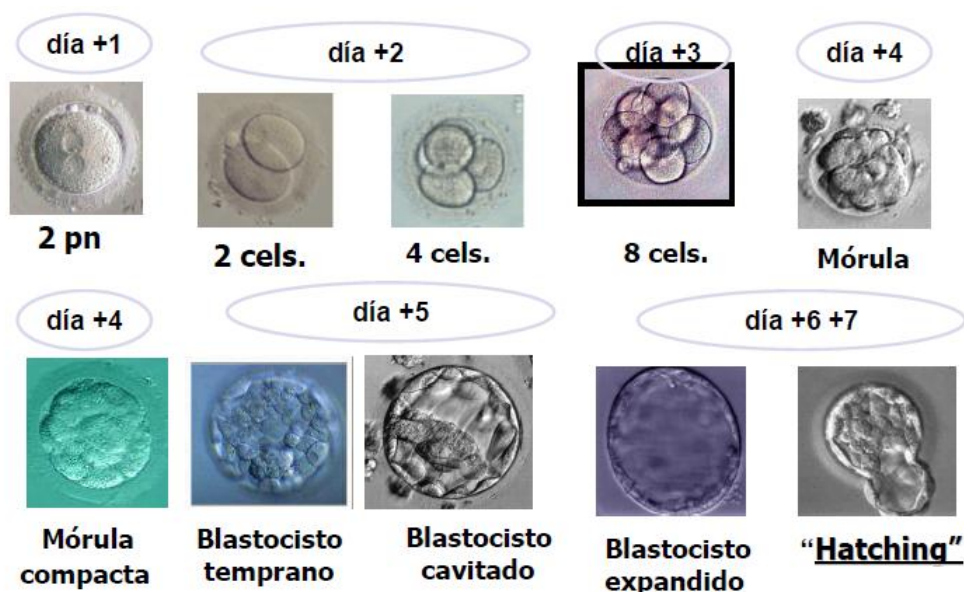
**Figura 26.** Formas anómalas de fecundación del ovocito.



**Figura 27.** Formas anómalas de fecundación del ovocito.

## ▪ Evaluación embrionaria

Los embriones han de evaluarse diariamente en el microscopio invertido para observar la evolución y las características morfológicas de cada uno de ellos, además se aprovecha para cambiarlos a una nueva placa de cultivo. Si se dispone de sistema “Time-Lapse” no es preciso cambiar los embriones de placa de cultivo, ya que al ser microfilmados en el interior del incubador, no se hace necesaria su extracción del mismo para observarlos. Todo equipo que trabaja en reproducción asistida trata de seleccionar los mejores embriones para transferir, tanto en fresco como criopreservados. La valoración de la calidad embrionaria, aunque parezca bien definida, está sujeta en gran parte a criterios subjetivos que dependen del embriólogo que la realiza, por lo que se hace necesaria una unificación de dichos criterios dentro del equipo de trabajo, para así poder evaluar los resultados, tanto interna como externamente.



**Figura 28.** Evolución embrionaria normal hasta blastocisto.

La calidad embrionaria es evaluada en día (D) +2, +3, +4 y +5 (Fig. 28). En D+2 y D+3 existe una clasificación basada en las variables velocidad de división celular, fragmentos celulares, tamaño de las blastómeras, multinucleación, zona pelúcida, citoplasma y compactación celular (Tabla 11) (ASEBIR, 2015).



**Tabla 11.** Clasificación embrionaria por calidades (ASEBIR, 2015)

Grado	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
<b>A</b>	D+2	4	≤10%	estadio-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
<b>B</b>	D+2	5	>10-25%	4→7 células NO estadio-específico en D+3	NO	≤50% células con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
<b>C</b>	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células NO estadio-específico	1 cél. bn D+2, o bien 1-2 cél. bn D+3 y el resto como Grado A <sup>(1)</sup>	≤50% células con vacuolas grandes
	D+3	6, 11, 12 2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10				
<b>D</b>	D+2	3 (NO estadio-específico), > 6	>35%	3 células No estadio-específico en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% células con Vacuolas pequeñas, o bien Grave alteración citoplasm. <sup>(2)</sup>
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				

#### ▪ Cultivo de embriones

La transferencia de embriones se realiza a ser posible generalmente en D+3 con la finalidad de realizar mejor la selección de embriones, aunque en realidad no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a tasas de embarazo entre D+2 y D+3. Si el número de embriones generados lo permite, podemos seguir cultivándolos hasta el estadio de blastocisto, lo que permitirá una mayor selección de los mismos, ya que no todos los embriones tienen capacidad para llegar a D+5. El objetivo del cultivo prolongado es, por un lado, lograr embriones con mayor potencial implantatorio y, por otro, mejorar la sincronía del binomio embrión-endometrio, con lo cual aumentaría la tasa de gestación y disminuiría el riesgo de gestación múltiple al permitirnos la transferencia electiva de embrión único. Existen 2 técnicas disponibles para cultivo prolongado de embriones denominadas cultivo secuencial y cocultivo, siendo la primera la más extendida.

#### ▪ Criopreservación de embriones y gametos

Los avances en estimulación ovárica controlada y en el laboratorio de reproducción asistida hacen que, por un lado, crezca el número de embriones que no serán

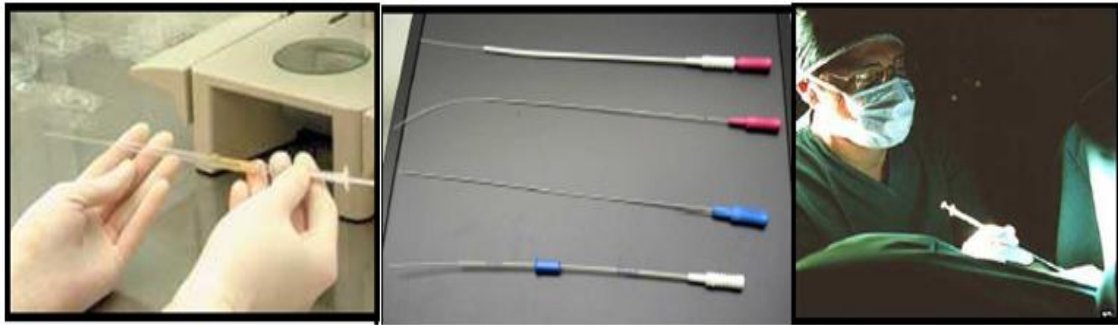
transferidos en fresco, y por otro, los ovocitos y espermatozoides, tanto de eyaculado como de biopsias testiculares, sean criopreservados por distintos motivos. En cuanto a embriones, la optimización de criterios para su selección nos permite reducir el número de éstos para ser transferidos en fresco, con lo que se genera un número considerable de los mismos que deberán ser criopreservados con el consentimiento de los progenitores. La ventaja de criopreservar embriones, por un lado es permitir la opción de embarazo sin la necesidad de someterse a una HEOC ni a una POF y, por otro, diferir la TE en casos de riesgo de SHO. Los embriones se pueden criopreservar en estadio de cigoto, en D+2, en D+3 y en blastocisto. Los protocolos de criopreservación actualmente más utilizados se basan en la congelación ultrarrápida o vitrificación, por un lado, y la congelación lenta con menor aceptación hoy día, por otro.

➤ Transferencia embrionaria

Es la última fase de la FIV/ICSI. La paciente debe ser informada sobre el número, madurez y anomalías de los ovocitos recuperados, fecundados, bloqueos embrionarios, calidades embrionarias, cultivos, criopreservación, etc. La legislación actual permite la transferencia de hasta 3 embriones, sin embargo, clínicamente el número de ellos a transferir dependerá de varios factores como la calidad embrionaria, la edad de la paciente, el número de transferencias realizadas anteriormente y la existencia de gestaciones previas.

En el laboratorio, el embriólogo, bajo lupa binocular en la campana de flujo laminar a 37°C, carga los embriones utilizando el menor volumen de medio posible, desde una palca con medio de cultivo, en un catéter de transferencia lo menos rígido posible, previamente lavado con el mismo medio, acoplado a una jeringuilla de insulina. En seguida, el embriólogo transporta el catéter de transferencia cargado y debidamente protegido al quirófano donde espera el ginecólogo con la paciente preparada, con el espéculo colocado exponiendo el cérvix, previamente lavado con suero fisiológico para eliminar el moco. Por último, el ginecólogo, a ser posible bajo control ecográfico, introduce el catéter por el orificio cervical externo y deposita la gota que contiene los embriones en el interior de la cavidad endometrial con cuidado de no tocar el fondo uterino (Fig. 29). Tras terminar la transferencia, el embriólogo comprueba que no ha quedado ningún embrión dentro del catéter, en cuyo caso habría que repetir el proceso.





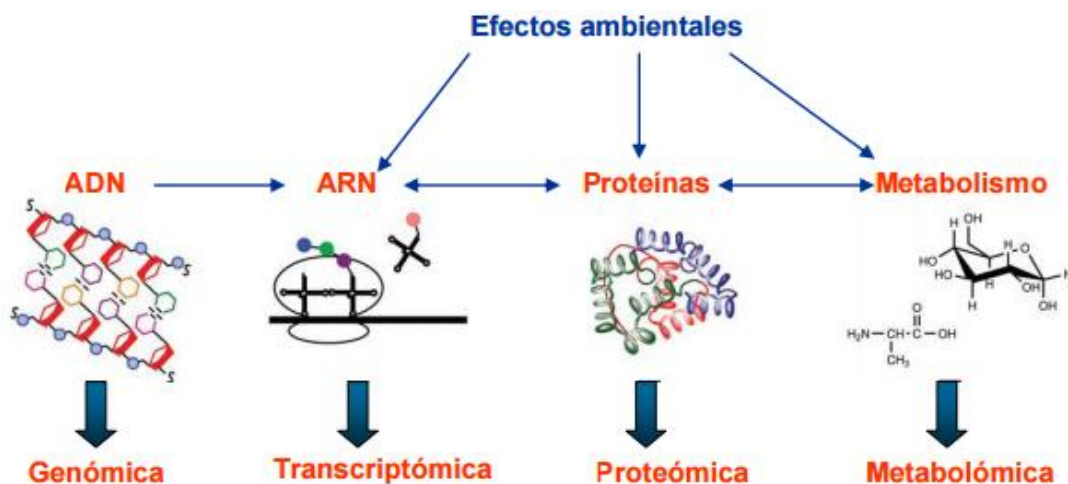
**Figura 29.** Catéteres y acto de la transferencia embrionaria.

## 1.9. NUEVAS TECNOLOGÍAS APLICADAS A LA SELECCIÓN EMBRIONARIA

La selección embrionaria pretende mejorar la eficiencia del proceso aumentando las tasas de embarazo, estimadas en un 30-40% con ovocitos propios y un 50-60% con ovocitos donados y reducir la tasa de múltiples estimada en un 25% de embarazos gemelares del total logrado mediante FIV/ICSI (Patrizio et al., 2009).

Actualmente está más extendida la selección embrionaria basada en criterios de valoración morfológica (Cuadernos de embriología clínica de ASEBIR, 2015). La tendencia es transferir 1 ó 2 embriones de la mejor calidad posible seleccionados morfológicamente, con lo que se lograrían mejorar las tasas de implantación, aunque el fin último va dirigido a la transferencia de un único embrión, lo que supone el perfeccionamiento de los criterios de selección que definen la calidad embrionaria.

Se están desarrollando alternativas a la selección morfológica basadas en la capacidad de medir cambios rápidamente de manera consistente, fiable y reproducible sin dañar al embrión. Las técnicas empleadas en este sentido pueden ser, por un lado, invasivas (con biopsia embrionaria), como la genómica (35.000 genes), transcriptómica (100.000 cadenas de ARNm) y proteómica (1.000.000 de proteínas), y por otro lado, no invasivas, como la secretómica, metabolómica (2.500 metabolitos), consumo de oxígeno (Fig. 30) y morfocinética embrionaria con evaluación permanente (“time-lapse”)



**Figura 30.** Técnicas alternativas de selección embrionaria.

Los avances relacionados con las técnicas de fecundación in vitro se basan en una serie de progresos significativos a nivel médico y tecnológico. Estas nuevas perspectivas de trabajo se traducen en una mayor cantidad y calidad de los embriones disponibles para la transferencia (y/o para congelar); de acuerdo a estas condiciones, la transferencia de más de un embrión por ciclo de tratamiento se ha convertido en una práctica común debido a que la mayoría de embriones generados mediante FIV/ICSI tienen una viabilidad relativamente baja y a que no existen herramientas para identificar eficazmente a los embriones con mayor potencial de implantación (Kovalevsky et al., 2005). Con el objetivo de transferir el embrión con mayor potencial implantatorio se están desarrollando herramientas con estandarización de *marcadores de calidad embrionaria* como complemento de la selección exclusivamente morfológica.

- **Marcadores clásicos**

En las tres últimas décadas, la evolución de los métodos de observación embrionaria no ha experimentado cambios de especial importancia. Aunque se han acumulado una gran cantidad de datos morfológicos y de experiencia, todos los métodos de examen descansan sobre el mismo instrumental y la misma representación visual; sin embargo, gracias a estas mediciones ha sido posible profundizar en la apariencia de un embrión óptimo en diferentes etapas del desarrollo. La evaluación morfológica, aunque imperfecta, es actualmente el método más popular de selección embrionaria previo a la

transferencia. Históricamente, el embriólogo se ha basado en las observaciones realizadas al microscopio óptico para describir las características morfológicas de un embrión como indicadores potenciales de la viabilidad. Sin embargo, el empleo de criterios de selección morfológica basados en métodos de observación estáticos deriva en tasas de implantación que todavía son relativamente bajas en relación al número de embriones transferidos, siendo la explicación más probable que el examen de la calidad embrionaria en un momento determinado no es representativo del desarrollo global ni del gameto ni del embrión, por lo que las conclusiones extraídas de la valoración morfológica pueden ser engañosas en relación a la competencia embrionaria. Además, los resultados obtenidos cuando se transfieren embriones congelados son similares o incluso mejores con respecto a la transferencia de embriones frescos, sobre todo los que evolucionan favorablemente a blastocisto, lo que hace sospechar que se ha errado en la identificación del embrión con mayor competencia evolutiva, lo cual constituye otra prueba de que los métodos convencionales de selección embrionaria no son especialmente fiables (Levens et al., 2008).

Los métodos actuales de selección embrionaria incluyen el análisis de los gametos y embriones en distintas etapas del desarrollo comenzando con los ovocitos, seguido de los cigotos en pronúcleos y de las sucesivas divisiones embrionarias hasta que se alcanza el estadio de blastocisto; adicionalmente, se han estudiado otros marcadores como la morfología ovocitaria, el “score” pronuclear y la división temprana (Rienzi et al., 2005). Todos estos parámetros complementan individualmente o en conjunto la evaluación “original” del embrión, aunque su utilidad y aplicación práctica sean objeto de un intenso debate.

Mientras que el examen morfológico tiene la ventaja de ser un método sencillo, no invasivo y rápido, presenta el inconveniente de ser poco fiable, altamente subjetivo, que precisa de formación especializada y cierto grado de experiencia y con pocas esperanzas de estandarización. Además, la definición de calidad embrionaria es un concepto vago e impreciso; incluso en el mejor escenario posible, donde la calidad embrionaria se determina retrospectivamente en función de las tasas de gestación, los embriólogos únicamente pueden inferir la calidad de los embriones que han gestado. Resulta inquietante advertir que esta definición tan imprecisa de los fenotipos deseados impacta directamente sobre la interpretación de los resultados, ya que actualmente no podemos apreciar su valor sin ser capaces de situarlos dentro de un contexto fisiológico.

- **Nuevos marcadores**

Las limitaciones de los criterios morfológicos de selección embrionaria han conducido al desarrollo de nuevas tecnologías con el propósito de conocer el potencial reproductivo de un embrión en concreto. Por lo tanto, la búsqueda de un test objetivo y fiable que evalúe la viabilidad tanto del ovocito como del embrión y que conduzca a un descenso en las tasas de gestación múltiple mientras se mantienen los resultados globales, se ha convertido en uno de los desafíos más importantes de la medicina reproductiva contemporánea. Hasta hace relativamente poco tiempo, se partía del fenotipo como principal fuente de información para el estudio de una patología y/o para describir la eficacia de un determinado procedimiento médico. Aunque estas aproximaciones son valiosas, actualmente se dispone de técnicas que amplían la descripción fenotípica y cuya aplicación clínica está condicionada por su complejidad metodológica y porque precisan de cierto grado de manipulación embrionaria. La posibilidad de acceder a estos conocimientos supone una nueva forma de pensamiento global en lo que a cuestiones biológicas se refiere, aunque la interpretación y gestión de esta información precise el desarrollo de herramientas estadísticas y bioinformáticas de probada eficacia y potencia.

- **Respiración ovocitaria**

El estudio del metabolismo embrionario, y en particular del consumo de oxígeno, puede mejorar la selección embrionaria a partir de la identificación de los embriones con mayor competencia en el desarrollo (Tejera et al., 2011). Este factor está considerado como el mejor indicador de la actividad metabólica global (Overström et al., 1989) y como un parámetro importante en la evaluación de la calidad embrionaria (Harvey et al., 2004). Los resultados obtenidos aportan información relativa a la carga mitocondrial del ovocito, un factor indicativo del crecimiento y maduración ovocitaria, ya que si un ovocito tiene poco material mitocondrial, no será capaz de completar la fecundación ni sostener el posterior desarrollo embrionario como consecuencia de la escasez de ATP (Dumollard et al., 2007). Se ha podido determinar la relación directa entre el consumo de oxígeno y la calidad embrionaria, aplicándose por primera vez este análisis en la rutina clínica (Tejera et al., 2011). La posibilidad de determinar tasas individuales de respiración en diferentes etapas del desarrollo embrionario puede resultar útil en el estudio de procesos biológicos como la respuesta embrionaria en situaciones de estrés o qué impacto tiene la congelación sobre las membranas de los orgánulos celulares.

## - **Recambio de aminoácidos**

En las últimas décadas, la comunidad científica ha manifestado un gran interés sobre cómo los embriones tempranos modifican el medio de cultivo in vitro. A raíz de esta curiosidad, se publican trabajos que demuestran que la presencia de determinados aminoácidos en el medio de cultivo mejora el desarrollo embrionario en modelos animales y en humanos (Devreker et al., 2001). El experimento clave que vincula el perfil aminoacídico con el potencial de desarrollo embrionario fue diseñado por Houghton, quien demostró que el modo en el que embriones de día 2 modifican el contenido en aminoácidos del medio de cultivo puede ayudar a predecir su posterior desarrollo a blastocisto. El trabajo mencionado, es el primero en revelar la conexión entre viabilidad embrionaria y consumo/síntesis de aminoácidos, independientemente de otros factores como la evaluación morfológica (Houghton et al., 2002).

## - **Las “-ómicas” como herramientas de investigación.**

Estas nuevas tecnologías están cambiando la percepción sobre la fisiología de los mamíferos al tratarse de instrumentos que amplían la descripción fenotípica.

.- **Genómica.** La secuencia del DNA condiciona la síntesis de proteínas y el fenotipo, por lo que no se puede descartar la presencia de determinantes genéticos relacionados con la viabilidad embrionaria, aunque las variaciones específicas del DNA relacionadas con una mejora en las perspectivas de desarrollo aún no han sido identificadas. El estudio de la integridad y de la dotación cromosómica es importante debido a que las aneuploidías no son compatibles con el desarrollo de individuos sanos, son la causa más común de aborto espontáneo y son mucho más frecuentes a nivel embrionario (Munne et al., 1995).

.-**Transcriptómica.** Se basa en la identificación de genes que se expresan diferencialmente entre dos o más situaciones de estudio y que resultan adecuados en la caracterización de marcadores diagnóstico; las ventajas derivadas de estos estudios se deben a que los cambios fisiológicos no se traducen en variaciones importantes de la expresión génica y a que la mayoría de genes que actúan conjuntamente en un contexto concreto son buenos indicadores de una respuesta fisiológica real (Hamel et al., 2010).

.- **Proteómica.** La caracterización de las proteínas expresadas y secretadas por el embrión durante todas las etapas de desarrollo preimplantatorio aportan una nueva visión de los procesos biológicos y celulares afectados; los resultados indican que

embriones morfológicamente similares presentan perfiles proteicos distintos y que una activación adecuada del genoma embrionario, y del proteoma, actúa como un factor crítico del potencial de desarrollo embrionario (Katz-Jaffe & Gardner, 2008).

Las “-ómicas” descritas hasta ahora tienen en común un carácter invasivo y que ninguna de ellas es lo suficientemente sencilla como para incorporarla a la práctica diaria del laboratorio de Embriología. Pese a estas dificultades, se consigue poner a punto una nueva metodología de fácil aplicación basada en el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario.

**.- Metabolómica.** El examen de los metabolitos presentes en el medio de cultivo se erige en un método potencial de selección embrionaria que optimiza las oportunidades de gestación mejorando la eficacia de los tratamientos de FIV/ICSI. Los estudios publicados hasta el momento describen una correlación directa entre el perfil metabólico y la viabilidad embrionaria. Los perfiles metabólicos que caracterizan a los embriones en distintas etapas del desarrollo están estrechamente relacionados con la competencia del embrión, y por tanto, son capaces de predecir el resultado del ciclo (Dominguez et al. 2008).

#### - **Morfocinética embrionaria (Time-lapse)**

Se han desarrollado sistemas para controlar el momento de la fecundación y los cambios en el embrión en todo su desarrollo hasta la etapa de blastocisto mediante el registro de imágenes tomadas a lo largo de su evolución. Los dos modelos más conocidos son el Embryoscope® y el Primo Vision® con la diferencia de que el primero es un incubador con la posibilidad de introducir 6 pacientes con 12 embriones cada una, mientras que el segundo es un dispositivo con cámara acoplada para controlar un solo caso y se instala en el incubador convencional. La principal ventaja que ofrece este sistema es que no hay que extraer los embriones del incubador para ser observados al microscopio aumentando hasta un 10% las posibilidades de gestación (Meseguer et al., 2011). Los parámetros morfocinéticos observados son la división temprana, sincronía de la división, número inadecuado de células en la división celular, desigualdad celular, fragmentación como proceso dinámico, multinucleación y momento celular, además de otros parámetros recientemente incluidos como la duración del ciclo celular, el horario de la división y los planos de dicha división celular (Herrero et al., 2013).

## 1.10. MATRICES BIOLÓGICAS DE EXPOSICIÓN A TÓXICOS: EL PELO

La determinación de drogas de abuso en pelo es hoy en día una técnica habitual implantada en los laboratorios de toxicología forense que siguen las recomendaciones propuestas por la “*Society of Hair Testing*”(SoHT) (Society of Hair, 2004). El pelo es una muestra biológica alternativa de fácil recogida, difícil adulteración, que no necesita condiciones especiales de conservación y, además, permite demostrar consumos anteriores a la toma de muestra. Es por ello que sus aplicaciones son cada día numerosas, incluida la posibilidad de determinación de marcadores de consumo crónico de alcohol etílico. No obstante, los métodos analíticos no están aún estandarizados por lo que ha de realizarse una correcta interpretación de resultados y tener en cuenta las limitaciones que esta muestra biológica presenta.

La investigación toxicológica de drogas de abuso en distintas matrices biológicas ha sido siempre objeto de estudio y se ha desarrollado enormemente en los últimos años.

La sangre y la orina han sido, a lo largo del tiempo, las muestras biológicas más utilizadas para el análisis de drogas de abuso. La incorporación de las drogas en estos fluidos es bien conocida y el análisis y la interpretación de resultados se han convertido ya en hábito en los laboratorios de toxicología. Sin embargo, en las últimas décadas se han comenzado a utilizar las "muestras alternativas", que ofrecen muchas ventajas frente a las muestras convencionales. Esto ha sido posible por el desarrollo reciente de técnicas analíticas de alta sensibilidad, que permiten la utilización de estas matrices, en las que, generalmente, se dispone de poca cantidad de muestra y con bajas concentraciones de tóxico, pero que son más fáciles de recoger y difíciles de adulterar.

Tras la absorción de una droga, la distribución, el metabolismo y las vías de excreción justifican la aparición secuencial de esta y sus metabolitos en diferentes tejidos y fluidos. Las propiedades fisicoquímicas de la droga y del fluido biológico pueden ser utilizadas para racionalizar la aparición de la droga en un fluido corporal o compartimento corporal. El *pKa*, la *liposolubilidad*, *enlace a proteínas* y la *composición de los fluidos biológicos* determinan en gran medida en qué fluidos la droga está presente.

En general, la elección de muestra biológica que analizar está condicionada por una serie de factores:

1. Recogida de muestra.



2. Análisis propiamente dicho.

3. Interpretación de resultados.

En cuanto a la recogida de muestra, se valorará: la invasividad, el riesgo de infección, la facilidad y rapidez de recogida, la necesidad de tener personal especializado para la toma, la facilidad de adulteración, la posible contaminación, así como el volumen de muestra recogida.

En relación con el análisis, su finalidad cualitativa o cuantitativa, la ventana de detección, la concentración/acumulación de droga en la muestra, la estabilidad de la droga, la necesidad de almacenamiento especial, el pretratamiento, así como la posibilidad de interferencias, disponibilidad de técnicas analíticas, la rapidez de análisis y el requerimiento de personal especializado, son también condicionantes en la elección de la muestra biológica que analizar.

Por último, la interpretación de resultados es también un determinante, en relación con los posibles efectos farmacológicos y el indicador de uso reciente de droga (horas), exposición a corto plazo (días), exposición a largo plazo (semanas), sin olvidar en algunos casos la validez medicolegal del análisis cuando esta es importante.

Es importante, además, conocer los tiempos de aparición y desaparición de las drogas de las diferentes muestras biológicas (Tabla 12), sobre todo de aquellas de gran utilidad en toxicología clínica y forense.

**Tabla 12.** Tiempo de aparición y desaparición de las drogas en MB\*

<b>Matriz</b>	<b>Aparición</b>	<b>Desaparición</b>
Plasma	1-2 h	Menos 24 h
Saliva	1-2 h	24-26 h
Orina	2-4 h	3-6 días
Sudor	2-4 h	3-6 días
Pelo	1 semana	Hasta 1-2 años

\*MB: matrices biológicas.

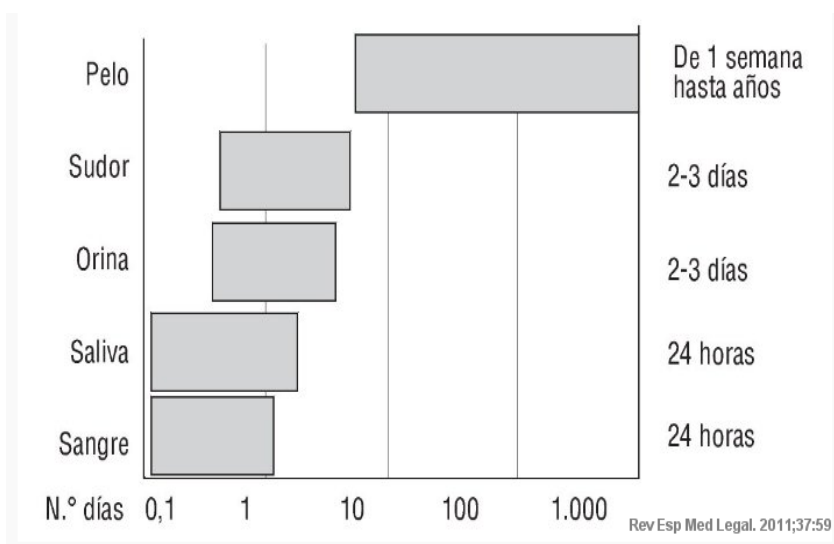
Actualmente el principal obstáculo al uso de toda la variedad de matrices alternativas está representado por la ausencia de métodos de análisis universalmente aceptados y estandarizados. Así, el pelo y las matrices queratínicas, en general, están adquiriendo relevancia dentro de las muestras biológicas, existiendo ya materiales de



referencia y valores de corte a qué atenerse. Por el contrario, muestras como la saliva o el sudor están aún en fase de estudio, aunque la SAHMSA (Substance Abuse Mental Health Service Administration) haya establecido una guía y valores de corte también para estas dos muestras (Kronstrand et al., 2013).

- **Muestras biológicas alternativas**

Estas muestras presentan muchas ventajas frente a las convencionales como, principalmente, la facilidad de recogida, la dificultad de adulteración y las diferentes ventanas de detección que presentan. Dichas ventanas, como puede verse en la figura 31, van desde pocas horas hasta años, por lo que, según la finalidad de nuestro análisis, la elección de la muestra puede ser diferente.



**Figura 31.** Ventanas de detección de sustancias en distintas matrices biológicas.

**Tabla 13.** Matrices biológicas y sus aplicaciones en Toxicología y Farmacología.

Fluido/Matriz	Farmacología clínica	Toxicología Forense	Toxicología Clínica	Correlación con niveles plasmáticos	Correlación con efectos farmacológicos / toxicológicos	Invasividad	Dificultad de procesamiento
Plasma	+++	+	---		---	--	-/-
Orina	+	+	+++	+/-	+++	+	.
Lágrimas	-/-	.	.	.	.	.	.
Uñas	+/-	++	.	.	.	.	+/-
LCR	--	.	.	.	--	+++	--
Secreciones bronquiales	+	.	+	.	++	.	.
Fluido intersticial	-	.	.	++	+	+++	--
Fluido seminal	+	.	++	+/-	++	.	++
Bilis	-/-	+	.	-/-			
Heces	+/-	.	.	.	.	.	+
Meconio	.	+	.	.	--	.	+
Sangre cordón umbilical	.	.	++	++	++	+	+/-
Líquido amniótico	.	+	.	+/-	--	+++	+++
Leche materna	+	.	++	+	++	.	++
Humor vítreo	.	+++	.	+/-	+	+++	++
Fluido pericardio	.	+++	+	+/-	++	+++	+++
Saliva	+++	+	+++	++	+++	.	.
Sudor	--	+	++	+/-	+++	.	-/-
Pelo	++	+++	+	+/-	++	.	.

Dentro de las muestras biológicas alternativas, el pelo ha comenzado ya a utilizarse como muestra biológica en los años sesenta-setenta para evaluar la exposición a metales como el arsénico o el mercurio, al pensar que en dicha muestra estos compuestos serían almacenados por algún tiempo, por lo que su utilización era más recomendable que la de la sangre o la orina. Años más tarde, comienzan a realizarse análisis de compuestos orgánicos, entre ellos las drogas de abuso. Baumgartner en 1979 publicó un trabajo sobre la determinación de heroína en pelo por radioinmunoensayo y, a partir de ese momento, comenzó a utilizarse todo tipo de técnicas analíticas para este tipo de determinaciones. En 1995 se fundó la “*Society of Hair Testing*” (SoHT), que ha establecido las líneas que deben seguirse en los análisis de pelo, desde la recogida de la muestra, como su preparación y análisis propiamente dicho, estableciendo además valores de “*cut-off*” de referencia tanto para los procedimientos de cribado como los de confirmación. De hecho, en la actualidad es utilizado para determinación de todo tipo de xenobióticos (drogas, fármacos, hormonas, contaminantes ambientales, etc.) en ciencias forenses, toxicología clínica, etc (Tabla 13).

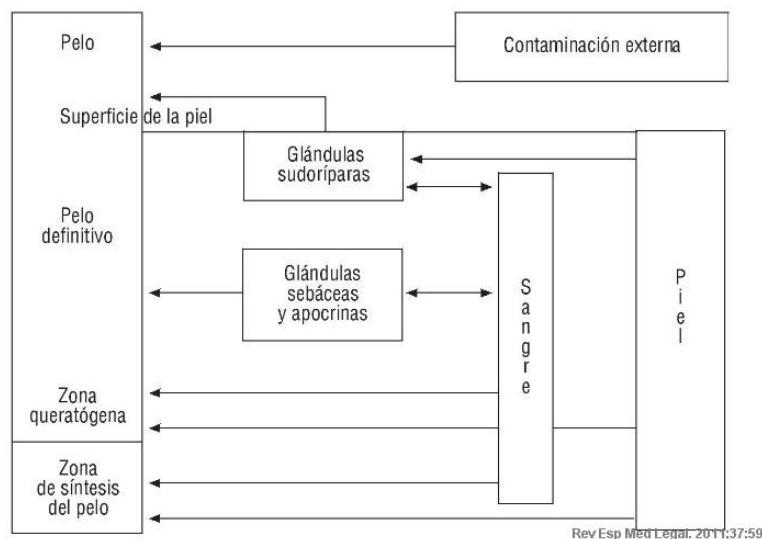
Hoy en día es la muestra no convencional cuya utilización se ha implantado más en los laboratorios de toxicología, al presentarse como una muestra alternativa a la orina para el análisis de drogas de abuso, principalmente cuando esta no es válida por haber transcurrido demasiado tiempo tras el último consumo.

La muestra de pelo permite demostrar consumo de drogas en momentos anteriores a la toma de muestra, ya que en ella aparecen las drogas a los 7-10 días tras el consumo y ahí permanecen retenidas indefinidamente. Esto es debido a las propiedades que tiene el pelo de almacenar, sin metabolizar, las diferentes sustancias que llegan a él transportadas por la sangre o el sudor, representando una alternativa al análisis de orina y de sangre cuando ha transcurrido demasiado tiempo desde el último consumo.

Es importante destacar, además, la facilidad de toma de muestra, así como el hecho de que no necesita condiciones especiales de almacenamiento y conservación.

El análisis de pelo no debe considerarse excluyente del de la orina, sino más bien como una prueba complementaria, aunque el resultado cuantitativo que proporciona sirve para evaluar la severidad y el modelo individual de consumo, cosa que no ocurre con los resultados obtenidos en la orina.

El mecanismo por el que las drogas se incorporan al pelo es bien conocido ya desde hace algunas décadas. El modelo multicompartimental es hoy en día el más aceptado. Según este modelo, las drogas llegan al pelo por varias vías: primero desde la sangre que irriga el folículo piloso, por lo que la droga se incorpora al tallo del crecimiento del pelo. Además, llegan también desde el sudor y las secreciones de las glándulas sebáceas y apocrinas que rodean al folículo piloso, y por esta vía se incorporan ya en el pelo definitivo (Fig. 32). Ésto explicaría uno de los motivos de la gran variabilidad que existe en las concentraciones detectadas en el pelo entre individuos que consumen la misma dosis, debido a la gran variabilidad individual que existe en este tipo de secreciones (Henderson, 1993).



**Figura 32.** Mecanismo de incorporación de las drogas al pelo.

Por último, no se puede dejar de mencionar el tercer mecanismo de incorporación, la contaminación externa, sobre todo en el caso de las drogas que se consumen por vía inhalatoria o en las personas que manipulan grandes cantidades de droga. Esta vía ha de tenerse en cuenta siempre para evitar dar un falso resultado positivo. Por ello se recomienda un riguroso lavado de la muestra antes del análisis.

Una vez incorporadas, quedan retenidas en función de factores que dependen del pelo (cutícula, médula, color) y factores que dependen de la droga (estructura química, lipofilia, afinidad por la melanina, capacidad de penetración por la membrana). El efecto de la melanina sobre la incorporación de las drogas al pelo fue objeto de estudios por numerosos autores, demostrándose que, en general, las concentraciones de droga son más altas en los pelos pigmentados. En efecto, se ha señalado que las drogas establecen un enlace con la melanina que facilita su retención. Nakahara en 1992 diseñó un modelo experimental para estudiar la "capacidad incorporativa de las drogas en el pelo (ICR)", estudiando la relación existente entre la concentración de droga en sangre y en el pelo. Los resultados obtenidos han servido para clasificarlas en tres grupos según sea su *ICR*: alto, medio o bajo. En esta clasificación, sustancias como la cocaína, con un *ICR* alto, son retenidas con facilidad en el pelo, al contrario de lo que ocurre con otras sustancias como el metabolito

hidroxilado del cannabis, que por sus propiedades fisicoquímicas tiene dificultad para incorporarse a la matriz queratínica.

Una vez incorporadas las drogas al pelo permanecen almacenadas en él sin sufrir alteraciones durante un tiempo, siempre y cuando el pelo no haya recibido tratamientos cosméticos. En este caso, la estabilidad de las drogas en la matriz queratínica está afectada. Así, por ejemplo, se demostró la disminución en la concentración de compuestos anfetamínicos en pelos que previamente habían sido decolorados en comparación con aquellos que no habían recibido ningún tratamiento cosmético (Martins et al., 2008). Estudios similares han sido publicados para otras drogas. Además, se ha demostrado también que algunos tratamientos cosméticos producen interferencias analíticas que pueden dificultar la detección de las drogas. Éste es el caso del Minoxidil®, que impide la detección de los derivados trimetilsilados de la cocaína y sus metabolitos.

Los diferentes tipos de pelo que se encuentran en el cuerpo humano han sido propuestos para el análisis de drogas; no obstante, las diferencias en la biología de cada uno de ellos han de ser consideradas para una correcta interpretación de los resultados analíticos.

En general, el pelo del cuero cabelludo es el que se analiza con más frecuencia por ser el más fácil de recoger y tener mayor grado de crecimiento, aunque es el más expuesto a contaminación externa y su integridad fisiológica está más alterada por los posibles tratamientos cosméticos que sobre él se realizan. El vello púbico y el axilar también se analizan a menudo; en estos tipos de pelo, la contaminación por secreciones de las glándulas sudoríparas apocrinas y sebáceas es mayor. No obstante, en algunos casos es necesario recogerlos por tener una velocidad de crecimiento mucho más lenta que el pelo del cuero cabelludo y, por lo tanto, su análisis proporciona una información más prolongada en el tiempo, aunque en este caso el análisis secuencial no es posible.

Los resultados obtenidos analizando los diferentes tipos de pelo no son comparables, ya que se ha demostrado en numerosos estudios que el vello púbico es el que almacena mayor cantidad de drogas, debido a su lenta velocidad de crecimiento y a la posibilidad de contaminación externa por la orina.

#### ▪ **Recomendaciones de la SoHT**

La SoHT tras diversas reuniones con diferentes laboratorios, ha llegado a un consenso para establecer unas guías para el análisis de esta matriz biológica con recomendaciones que afectan a varios aspectos:

a) Recogida, transporte y conservación. La correcta recogida de pelo es fundamental para la realización del análisis. La muestra se debe recoger de la zona occipital y cortarse lo más cerca posible de la raíz, en una cantidad suficiente (200 mg, el diámetro de un lápiz), señalizando los extremos proximal y distal. Si se solicita un análisis secuencial, el mechón de pelo se debe coger con una cinta adhesiva antes del corte. El pelo de elección es el del cuero cabelludo, pero si no está disponible, se recurre a otras partes del cuerpo, como se ha mencionado anteriormente.

b) Además, es importante el envío de la muestra con la información necesaria para cada caso, anotando la longitud, el color y la posibilidad de aplicación de tratamientos cosméticos previos y, por supuesto, la zona del cuerpo donde se ha recogido la muestra.

c) Las condiciones de almacenamiento no deben alterar la muestra, por ello, se recomienda almacenar las muestras en una habitación oscura a temperatura ambiente.

d) En los casos post mórtem, el pelo debe ser recogido antes de empezar la autopsia, a fin de evitar posible contaminación por otras muestras biológicas.

e) La contaminación externa es considerada una de las principales limitaciones del análisis del pelo y, por ello, debe ser eliminada completamente o minimizada aplicando diversos métodos:

- Eliminando fuentes de contaminación externa en el propio laboratorio.
- Utilizando valores apropiados de “*cut-off*”.
- Realizando múltiples lavados con disolventes orgánicos o disoluciones acuosas.
- Conservando el líquido del último análisis para realizar eventuales análisis.

f) La desintegración o digestión del pelo y la extracción de las sustancias son diferentes para cada laboratorio, pero ha de asegurarse que no produce alteraciones en el patrón metabólico de cada sustancia.

g) Análisis de cribado y confirmación. Los primeros pueden efectuarse después de la validación de un método analítico que permita la correcta identificación de los analitos, con un “*cut-off*” que no dé falsos resultados negativos. En lo que respecta a los análisis de confirmación, que generalmente se basan en métodos espectrofotométricos, deben ser también validados y los resultados de positividad dados según los criterios recomendados por las sociedades científicas aceptadas internacionalmente.

**h)** Valores de corte (“*cut-off*”). Se han establecido valores de corte, a partir de los cuales un resultado debe considerarse positivo para los diferentes tipos de drogas. Así:

- *Opiáceos*: se considera positivo a partir de 0,2 ng/mg en los análisis de cribado y 0,2 ng/mg para cada sustancia en los análisis de confirmación. Además, debe diferenciarse el uso de heroína con el de codeína o morfina, lo que únicamente se consigue con la identificación de la 6-monoacetilmorfina (MAM).
- *Cocaína*: en este caso el punto de corte es de 0,5 ng/mg para las técnicas de cribado y 0,5 ng/mg para la cocaína y 0,05 ng/mg para cada uno de sus metabolitos en las técnicas de confirmación. En este caso, al menos uno de sus metabolitos debe ser identificado (benzoilecgonina, ecgonina metiléster, cocaetileno o norcocaína).
- *Anfetaminas*: se considera positivo a partir de 0,2 ng/mg en las técnicas de cribado y 0,2 ng/mg de cada anfetamina en las técnicas de confirmación.
- *Cannabis*: 0,1 ng/mg se considera el valor mínimo detectable en los métodos analíticos de cribado, y los mismos valores para el THC en las técnicas de confirmación, mientras que para su metabolito el THC-COOH, 0,2 pg/ mg es la cantidad mínima detectable. La identificación de este último, aunque sea a bajas concentraciones, es imprescindible para poder establecer un consumo de cannabis.

**i)** Controles de calidad internos. En el caso del pelo, no es fácil al no poseer materiales de referencia. Como alternativa, muestras positivas y negativas deben ser tratadas y analizadas conjuntamente con muestras reales para garantizar la calidad del análisis.

**j)** Controles de calidad externos. El laboratorio debe participar en controles interlaboratorios que reciben auténticos estándar de pelo para analizar conjuntamente con sus muestras habituales.

Recomendaciones similares han sido publicadas por la SAMSHA (Substance Abuse and Mental Health and Service Administration) que ha establecido normas para la recogida de muestra y valores de “*cut-off*”.

#### ▪ Interpretación de resultados

La principal ventaja del análisis de pelo es su capacidad de proporcionar información sobre un período preferentemente largo, además de acumular la sustancia inalterada en mayor concentración que sus metabolitos.

La acumulación de la sustancia madre permite no sólo distinguir el consumo de heroína del de morfina o codeína, a través de la identificación de la MAM, sino también el uso ilícito de anfetaminas de sustancias que se pueden metabolizar a compuestos similares, como ocurre con la fenetilina, la selegilina, el clobenzorex, etc. El patrón metabólico permitirá distinguir diferentes situaciones y diferentes consumos que pueden producir el mismo metabolito.

De hecho, la SoHT ha establecido unas relaciones mínimas de concentración entre sustancia madre y su metabolito para dar un resultado positivo y excluir la contaminación externa (MAM/morfina  $> 1,3$ ; BEG/cocaína  $> 0,05$  y presencia de THC-COOH para confirmar uso de cannabis).

A pesar de los esfuerzos efectuados para establecer criterios universales para dar un resultado de positividad, se deben considerar ciertos artefactos analíticos que puedan alterar la relación de los metabolitos. No siempre la relación entre la concentración de la sustancia madre y sus metabolitos entra en los criterios de positividad establecidos, aun tratándose de consumidores habituales. Un estudio puso de manifiesto tal aseveración al analizar el pelo de 75 consumidores habituales de cocaína (Cairns et al., 2004), donde BEG/cocaína no se ajustaba a lo establecido por la SoHT, detectándose, sin embargo, la presencia de norcocaína y cocaetileno, que indicaban un consumo previo de la droga. De hecho, se considera que cuando la concentración de cocaína en el pelo es superior a 2 ng/mg, este criterio no es válido.

Además, es necesario excluir la contaminación externa persistente debida a contactos con la droga en ámbitos de trabajo. Por otro lado, la utilización de valores de corte ("*cut-off*") adecuados para evitar dar falsos resultados positivos por contaminación externa puede acarrear el riesgo de dar falsos resultados negativos, aun disponiendo hoy en día de técnicas analíticas de alta sensibilidad que permitirían detectar valores mucho más bajos al "*cut-off*".

La interpretación del resultado analítico debe ser efectuada considerando numerosas variables, especialmente cuando se trata de análisis forenses. Así, quedó demostrado que la presencia de cocaína en pelo de sujetos tras algún período de abstinencia, por lo que se deben establecer con cautela los períodos de consumo/abstinencia (Felli et al., 2005).



Cuando no se dispone de muestra de cabello, se puede recurrir a otros tipos de pelo del cuerpo (pubis, axila, etc.), pero teniendo en cuenta la diferente biología de cada uno de ellos. Los mecanismos y tiempos de acumulación de los xenobióticos en estas matrices no están todavía aclarados, por ello se deben interpretar en este caso los resultados analíticos con muchísima cautela. No se tiene la certeza, además, de la ventana de detección de las diferentes drogas en estas muestras, considerada quizá hasta 2 años, ni las relaciones entre la sustancia madre y sus metabolitos, que probablemente son diferentes que en el cabello.

No se puede establecer una correlación entre dosis consumida y concentración detectada, ya que existe una gran variabilidad individual en la retención de las drogas en el pelo, como ya se mencionó anteriormente.

Tampoco se ha establecido la dosis mínima detectable, por lo que un negativo no siempre excluye un consumo y el resultado cuantitativo del análisis sólo indica la severidad del consumo.

En los últimos años, todos estos aspectos han sido estudiados, destacando las dificultades que a veces supone la interpretación correcta de los resultados en los análisis de pelo (Musshoff et al., 2007).

#### ▪ **Aplicaciones del análisis de pelo**

Las principales aplicaciones del análisis de pelo son aquellas derivadas de la amplia ventana de detección de las sustancias en la matriz queratínica.

Al ser una muestra biológica de fácil recogida y que no necesita condiciones especiales de conservación, los estudios epidemiológicos a gran escala son realizados sobre esta matriz. De hecho, han sido publicados numerosos estudios a este respecto, desde control de consumo de sustancias de abuso en población universitaria, hasta el control de consumo de cocaína durante la gestación a través del análisis del pelo del recién nacido y del propio vello púbico materno.

Entre las múltiples aplicaciones que tiene el análisis de pelo, el seguimiento de pacientes sometidos a curas de deshabituación es una de las más importantes, ya que se puede controlar de manera secuencial el cumplimiento terapéutico. De la misma forma, es de gran utilidad en las ejecutorias penales, sustituyendo de esta forma los frecuentes análisis de orina. Es utilizado, además, para demostrar consumos habituales de drogas de abuso en sujetos que han pasado a disposición judicial y cuya responsabilidad penal puede ser

modificada por su condición de drogodependiente. En este caso, el médico forense es el encargado de la toma de muestra y determina la necesidad de la realización de la prueba como medio diagnóstico para constatar tal adicción.

Los análisis de pelo también pueden ser utilizados en el ámbito laboral para controlar el consumo de sustancias de abuso por los trabajadores.

Es también utilizado con frecuencia en procedimientos civiles relativos a la custodia de hijos con el fin de controlar el consumo de drogas por parte de alguno de los progenitores. De hecho, ya han sido publicados trabajos que ponen de manifiesto la utilidad de esta muestra biológica para este fin.

En los últimos años ha comenzado a utilizarse esta muestra biológica para demostrar la administración de sustancias depresoras (benzodiazepinas, GHB, ketamina, etc.) a ancianos con fines criminales o en casos de agresiones sexuales. En este caso ha llegado a determinarse la sustancia después de una única dosis administrada tras el paso de un breve período. Para tal fin, ha de tenerse en cuenta que deben pasar al menos 4 semanas para la toma de muestra del pelo, para dar tiempo a que las sustancias se depositen en la queratina en crecimiento y, además, recoger una cantidad de muestra suficiente para realizar el análisis de drogas en secciones seriadas del cabello.

En el campo de la obstetricia se han realizado estudios del pelo para detectar exposición a tóxicos medioambientales, tabaco, alcohol y drogas de abuso en pelo, como matriz biológica alternativa de fácil acceso, utilizando técnicas de laboratorio de cromatografía en tándem acoplada a la espectrometría de masas (Garcia-Algar et al., 2008). En fertilidad solo hemos encontrado un estudio en la bibliografía consultada que trataba de detectar drogas de abuso en orina para exposición reciente y en pelo para exposición reiterada y prolongada en pacientes que iban a ser sometidas a una TRA con la detección del 4,8% de positivos (4,2% a cannabis, 1,4% a cocaína y 0,85% a ambas) (Pichini et al., 2012).

#### ▪ Limitaciones del análisis del pelo

El análisis de esta muestra biológica, que ha comenzado a utilizarse de forma extensiva en las últimas décadas, no está exento de limitaciones que han de tenerse en cuenta. Todavía hoy falta la total comprensión de los mecanismos de acumulación de las drogas en el pelo y la estandarización de los métodos analíticos necesarios, así como la correcta interpretación de resultados.

Los primeros problemas pueden surgir cuando la recogida de la muestra no es adecuada (por ejemplo, longitud inadecuada del mechón). La muestra debe ir acompañada de la máxima información posible, incluyendo datos de la historia clínica, el propósito de la investigación, sospecha de drogas y tiempo de consumo, etc.

Además, la posibilidad de dar un falso positivo por contaminación externa siempre existe si el proceso de lavado de la muestra no ha sido suficientemente riguroso.

Se ha demostrado en sucesivas ocasiones que la correlación existente entre dosis consumida y concentración detectada es limitada debido a las diferencias interindividuales que existen en relación con los procesos metabólicos y picos plasmáticos, así como de la propia incorporación de las drogas en el pelo, su pigmentación y su estado físico. Por todo ello, se aconseja que cada laboratorio, que utiliza sus propios métodos analíticos, sea el encargado de realizar estadísticas entre sus casos.

#### ▪ Conclusiones

El pelo es una muestra biológica alternativa de gran utilidad hoy en día en el campo de la pericia médico-legal, además de estar siendo investigado en otras disciplinas, pero los resultados obtenidos en el análisis han de interpretarse con suma cautela por la cantidad de parámetros que pueden afectarlo.

### 1.11. INFLUENCIA DE LOS TÓXICOS MEDIOAMBIENTALES SOBRE LA SALUD Y LA FERTILIDAD

Nuestra legislación ("Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas," 1995) recoge dos grupos de sustancias: las de efecto embriotrópico, y aquellas sustancias tóxicas para la fertilidad, de efectos gonadotrópicos, que ejercen su acción sobre las gónadas alterando su normal funcionamiento, sobre los gametos alterando la información hereditaria, o sobre el sistema endocrino comportándose como **disruptores endocrinos**. Los cuadros patológicos derivados de su acción pueden manifestarse como alteraciones de la libido, del comportamiento sexual, de la función endocrina, del acoplamiento, la espermatogénesis y ovogénesis y sobre la duración de la vida reproductiva.

Además de diversas sustancias tóxicas, se da especial importancia a los hábitos de vida, que influyen en diferentes aspectos como son la edad avanzada a la hora de

buscar un hijo, la obesidad o delgadez, el consumo de alcohol, el tabaquismo, la cafeína y el estrés, entre otras.

Las sociedades científicas han elaborado documentos donde se recogen las evidencias existentes sobre *estilos de vida y fertilidad* con el fin de poder argumentar, tanto a las parejas con deseos genésicos, como a los profesionales intervinientes, las recomendaciones oportunas para así poder, por un lado de optimizar los resultados y, por otro, desterrar las viejas creencias y mitos sobre la fertilidad. El conocimiento de la influencia medioambiental en el que están inmersos el hombre o la mujer con problemas de fertilidad facilitaría el diagnóstico, tratamiento y/o consejo sobre su problema reproductivo (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive & Infertility, 2013).

Existen unos mecanismos de acción generales de los tóxicos sobre la fertilidad, los cuales ejercen su acción a 3 niveles:

- Las gónadas alterando su normal funcionamiento.
- Los gametos alterando la información hereditaria.
- El sistema endocrino comportándose como disruptores endocrinos.

Los cuadros patológicos derivados de su acción pueden manifestarse como alteraciones de:

- La libido.
- Comportamiento sexual.
- Función endocrina.
- Espermatogénesis.
- Ovogénesis.
- Duración de la vida reproductiva.

#### **1.11.1. Contaminación química global.**

A mediados de 1950 los esquimales no sabían qué era padecer cáncer. En los sesenta se encontraron trazas de plaguicidas en su organismo y empezaron a aparecer los primeros casos de esta enfermedad. En las últimas décadas, los problemas de fertilidad en parejas jóvenes han aumentado progresivamente, y se ha producido una caída en picado del nivel de espermatozoides; al mismo tiempo, la tasa de cáncer de mama asciende de forma preocupante. Algo está pasando en los mecanismos de reproducción sexual y gran parte del

problema está relacionado con sustancias tóxicas provenientes de nuestro entorno que permanecen en nuestros cuerpos. Es lo que se conoce como "disrupción endocrina", es decir, la combinación de sustancias químicas que en nuestro organismo pueden actuar como hormonas artificiales, alterando la reproducción. Bien es cierto que nadie puede negar que los productos químicos aportan importantes beneficios para la sociedad, a través de su uso en la asistencia sanitaria por ejemplo, existen numerosas evidencias de que algunos de ellos están dañando la vida silvestre y por desgracia a los seres humanos. En muchos casos desconocemos los efectos a largo plazo sobre la salud de los productos químicos que forman parte de nuestro estilo de vida, y es que en la actualidad podemos decir que se utilizan productos químicos artificiales en todo lo que nos rodea, de los plaguicidas a los cosméticos, desde los biberones a los ordenadores: la sociedad del siglo XXI depende de ellos.

Por un lado, el mundo de la alta tecnología ha experimentado una aceleración constante y progresiva en los últimos treinta años. Cada año, los fabricantes presentan nuevas maravillas técnicas para ganar posiciones en una carrera impuesta por las feroces leyes del mercado. Una de las consecuencias más inmediatas del consumo exacerbado es que, cada año, más dispositivos electrónicos acaban en los contenedores de basura. Sólo en España, las familias producen más de 100.000 toneladas al año de basura electrónica (frecuentemente denominada con el término anglosajón "E-Waste"). Si a esa cantidad se le añaden los desechos que produce el sector de la electrónica, el resto de la industria y los establecimientos comerciales, se alcanza la cifra en toda España de 200.000 toneladas de desperdicios electrónicos al año. Se estima que la producción global de basura electrónica es de 20-25 millones de toneladas por año, siendo la mayor parte producida en Europa, Estados Unidos y Australasia. No obstante, China, los países de Europa del Este y Latinoamericanos se convertirán también en grandes productores de basura electrónica durante los próximos diez años (Robinson, 2009). La basura electrónica contiene metales valiosos como del cobre o el platino, pero también numerosos contaminantes ambientales potenciales, especialmente plomo, estaño, mercurio, Cd, níquel, difeniléteres polibrominados (PBDEs) y bifenilos policlorados (PCBs). Además, la incineración de la basura electrónica puede generar dioxinas, furanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), entre otros. Una gran mayoría de esta basura electrónica es desechada, aun actualmente, en los vertederos, ya que la tecnología de reprocesamiento efectiva, que recupera la mayor parte de los materiales minimizando el impacto ambiental, es muy cara. En consecuencia, pese a ser ilegal en el marco del Convenio de Basilea (UNEP, 2009), los países ricos exportan cada año una

cantidad desconocida de desechos electrónicos a los países pobres, donde las técnicas de reciclaje incluyen la quema y la disolución en ácidos fuertes con muy pocas medidas para proteger la salud humana y el medio ambiente. Este tipo de “reprocesamiento” da como resultado inicial una fuerte contaminación local, pero que en breve plazo es seguida por la migración de los contaminantes a los acuíferos y finalmente a su incorporación a la cadena alimenticia. Los trabajadores del sector de los desechos electrónicos sufren efectos negativos en la salud por el contacto con la piel y la inhalación de estas sustancias (Qu et al., 2007) mientras que la comunidad en general está expuesta a los contaminantes a través del humo, polvo, agua potable y sobre todo de los alimentos (Chatterjee, 2007).

Por otro lado, otro gran sector de la industria química – el de los productos plaguicidas – ha contribuido enormemente en los últimos 70 años a incrementar los rendimientos del sector agrícola mediante el control de las plagas y enfermedades, y también en el control de la enfermedades transmitidas por insectos (paludismo, dengue, encefalitis, filariasis, etc) (Abhilash et al., 2009). La necesidad de aumentar la producción de alimentos para la población mundial en rápido crecimiento es bien conocida y una de las estrategias para aumentar la productividad de los cultivos es el manejo efectivo de plagas ya que más del 45% de la producción anual de alimentos se pierde por la infestación de plagas. En los países tropicales las pérdidas en los cultivos son aún mayores debido a que las elevadas temperaturas y el alto grado de humedad dan lugar a la proliferación de las plagas, por lo que la aplicación de productos plaguicidas es muy intensa en estos países Abhilash et al., 2009). Debido al uso y abuso de este tipo de productos se produce una considerable generación de residuos, lo cual repercute en el coste de los productos, pero sobre todo produce consecuencias adversas sobre la salud de los ecosistemas y del hombre. La aplicación inadecuada de plaguicidas afecta al medioambiente en su conjunto, haciendo que los residuos contaminen el suelo, el aire y las aguas y que finalmente alcancen la cadena alimentaria. El ser humano está por tanto expuesto a los residuos de plaguicidas por diferentes rutas (inhalatoria, digestiva y dérmica) y la exposición a dichas sustancias resulta en problemas agudos y crónicos de salud. Así, la exposición crónica a productos plaguicidas, aún a dosis muy bajas, ha sido relacionada con el aumento de la incidencia de cáncer, de enfermedades renales crónicas, inmunosupresión, esterilidad masculina y femenina, desórdenes endocrinos, o desórdenes neurológicos y del comportamiento entre otros (Luzardo et al., 2009). Obviamente la contaminación por plaguicidas del medio ambiente también afecta a la vida de las aves, la fauna silvestre, animales domésticos, peces y el

ganado. De entre todos los grupos de insecticidas preocupan especialmente los insecticidas organoclorados como el Diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorociclohexano (HCH), aldrina y dieldrina, ya que, aún hoy en día, se encuentran entre los plaguicidas más utilizados en los países en desarrollo de África y Asia debido a su bajo coste, eficacia y versatilidad en la lucha contra plagas y los insectos vectores de enfermedades. Sin embargo, debido a su potencial de bioacumulación y efectos biológicos, estos compuestos fueron prohibidos en los países desarrollados desde hace más de tres décadas (Zumbado et al., 2005). Su resistencia a la degradación ha dado lugar a la contaminación universal por estos compuestos que se encuentran en muchos compartimentos del medio ambiente. Según el inventario de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), más de 500.000 toneladas de plaguicidas obsoletos y no utilizados representan una amenaza real para el medio ambiente y la salud pública mundial.

Si bien hemos mencionado dos de los grandes sectores de la industria química, estos representan sólo una parte de la cantidad de productos químicos que se utilizan hoy en día, ya que hay que destacar que, a finales de la década de 1990, se habían registrado en la UE unos 100.000 productos químicos en el Catálogo europeo de sustancias químicas comercializadas (Agencia Europea del Medio Ambiente, 2007), siendo especialmente grave el hecho de que se sabe muy poco de la toxicidad a largo plazo de la mayoría de ellos. Sólo el 14% de estos cerca de 100.000 compuestos, aquellos que se fabrican en mayor cantidad, disponen actualmente de suficiente cantidad de datos toxicológicos como para poder valorar que no suponen un riesgo real para la salud. Así, numerosos estudios han demostrado que el ser humano puede contener en su sangre y tejidos hasta 300 sustancias químicas sintéticas y, como mencionamos anteriormente, muchas de ellas han sido claramente relacionadas con efectos adversos sobre la salud. Algunos de estos efectos adversos claramente demostrados son:

- En hombres: cáncer testicular, testículos no descendidos, bajo recuento de espermatozoides, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y enfermedades relacionadas con el lugar de trabajo como el asma o el aumento de incidencia en varios tipos de cáncer.
- En mujeres: aumento de cáncer de mama en un 50% desde 1971, linfoma no-Hodgkin, defectos de nacimiento (principalmente a nivel del tracto génito-urinario), aborto espontáneo e igualmente enfermedades relacionadas con el lugar de trabajo como el asma o el aumento de incidencia en varios tipos de cáncer.



- En niños: espectacular aumento de los cánceres infantiles, problemas de aprendizaje (déficit de atención con hiperactividad), debilitamiento del sistema inmunológico que conduce a una mayor susceptibilidad ante enfermedades comunes y desarrollo de pubertad precoz.

Como mencionamos anteriormente, la exposición humana a todos estos contaminantes y la razón por la que acaban apareciendo como “constituyentes” del organismo humano, puede provenir de diferentes fuentes, pero sin duda, a pesar de que la ingesta es variable entre las diferentes poblaciones, una proporción sustancial de la exposición total humana a ciertos productos químicos se produce por la *vía alimentaria*. Por ejemplo, la exposición a las *dioxinas* (dibenzo-p-dioxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados [PCDD/PCDF]) a través de diversos grupos de alimentos está bien caracterizada (Liem et al., 2000). Se estima que el 90% de la exposición humana a estas sustancias químicas se produce a través de alimentos, principalmente carne roja y productos lácteos debido a su alto contenido en grasa. Un muestreo de alimentos realizado entre 2001 y 2002 mostró cual era la contribución aproximada de cada grupo alimentario a la ingesta diaria de PCDD/PCDFs (basados en equivalentes de toxicidad con la 2,3,6,7-tetracloro-p-benzo-dioxina, *TEQs*): carne, 22-44%; productos lácteos y huevos, 12-15%; pescados, 4-9%; pollo y aves de corral, 4-5% (Yaktine et al., 2006). Estos resultados han sido recientemente corroborados por la Autoridad Europea en materia de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), si bien en este último estudio el alimento que más contribuye es el pescado y sus productos. La contribución de determinados grupos alimentarios, como el pescado o los productos lácteos, a la ingesta diaria de contaminantes químicos puede variar según el país o región geográfica (Sasamoto et al., 2006). Los hábitos dietéticos, la composición química de los alimentos, así como el período en el que se hacen los estudios pueden explicar las diferencias en la contribución de los alimentos a la exposición química global entre las diversas poblaciones humanas, por lo que los resultados de los estudios no son fácilmente extrapolables de una región a otra.

Existen numerosos factores sociales y demográficos como son el sexo, la edad, la raza o etnia, residencia urbana o rural, y la situación económica que están fuertemente asociados con variaciones en los hábitos alimentarios. Así, si nos fijamos por ejemplo en el consumo de grasas - de gran importancia cuando consideramos la ingesta de contaminantes químicos, ya que en su mayor parte se trata de sustancias liposolubles - la variabilidad es enorme, existiendo algunos países en los que se consumen menos de 30



g/día, como en países en vías de desarrollo, hasta otros en los que se consumen más de 130 g/día (FAO/WHO, 1994).

También los niveles de residuos presentes en los alimentos varían de región en región, debido a los patrones locales de uso y a las prácticas medioambientales y de políticas de seguridad alimentaria que modificarían la exposición dietética a los contaminantes (Chikuni et al., 1997).

El momento en el que se realiza el estudio del nivel de contaminación a través de los alimentos también es una variable que puede influir en la exposición dietética de los seres humanos, debido a posibles cambios estacionales en los patrones de alimentación, la ingesta de grasas totales, o los propios niveles de contaminantes de los alimentos que pueden variar debido a restricciones locales o al uso estacional de las sustancias químicas (Dejonckheere et al., 1996). No obstante, debido a su larguísima vida media, salvo que existan accidentes que provoquen una liberación masiva, es muy poco probable que pueda observarse este efecto estacional con los contaminantes químicos persistentes, como las PCDDs/PCDFs o los plaguicidas organoclorados (POCs) (Ryan et al., 1990). Por lo tanto, cuando hablamos de contaminantes químicos resistentes a la degradación, es necesario hacer un seguimiento prolongado para poder apreciar un cambio en la dosis interna.

Toda esta situación de contaminación medioambiental y de los alimentos con sustancias que producen efectos adversos sobre la salud es altamente preocupante y lógicamente no ha pasado desapercibida a las autoridades gubernamentales. Por este motivo, en el año 2006 la Unión Europea (UE) promulgó una ambiciosa y monumental iniciativa legislativa para el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las sustancias químicas (REACH). Había muchas razones para la promulgación del REACH, pero en general es una extensión del deseo global de que se produzcan menos productos químicos industriales, de comprender los posibles riesgos humanos y ecológicos de los que ya existen, y de asegurarse de que no se produce ninguna nueva catástrofe o amenaza relacionada con el uso de las sustancias químicas (Williams et al., 2009). De acuerdo con esta directiva comunitaria, salvo unas pocas excepciones, es necesario el registro de todas las sustancias químicas fabricadas o importadas en la UE. Esta inscripción en el registro generará un expediente que contendrá datos sobre las características físico-químicas, así como las propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas de cada una de las sustancias. Para muchos productos químicos, el examen de los peligros y riesgos derivados del uso de estas sustancias también se requerirá en forma de un informe de seguridad química. Comenzando

con el doble proceso de expediente y la evaluación de sustancias, la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA), los Estados miembros de la UE, y la Comisión Europea identificarán los productos químicos que representan riesgos inaceptables para la salud humana y/o el medio ambiente, y en consecuencia reducirán o restringirán su uso. No obstante, a pesar de que REACH es una ambiciosa estrategia de cara al futuro, no resuelve el problema de los contaminantes que ya han sido vertidos y están en circulación en el medioambiente. Por esto, varias organizaciones internacionales han desarrollado estrategias encaminadas a eliminar o reducir la producción, uso y liberación de las sustancias persistentes y bioacumulativas con efectos adversos para la salud, los denominados *contaminantes tóxicos persistentes (CTPs)*.

### **1.11.2. Los contaminantes químicos como disruptores endocrinos.**

En el apartado anterior hemos visto como en nuestra sociedad del siglo XXI vivimos rodeados de un cóctel de sustancias químicas, con capacidad de interaccionar con los animales y el hombre, siendo capaces en muchos casos de producir efectos adversos sobre la salud. Gran parte de los efectos adversos que tiene sobre la salud humana la exposición crónica a dosis bajas de estas sustancias, en el contexto de la exposición ambiental, han sido encuadrados en el fenómeno denominado *disrupción endocrina*. Por lo tanto los contaminantes químicos capaces de producir *disrupción endocrina* son denominados **DISRUPTORES ENDOCRINOS**.

Un disruptor endocrino (DE) es “un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión o eliminación de las hormonas que de forma natural están presentes en el cuerpo y que son las responsables de la homeostasis, la reproducción y el desarrollo” (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

El rango de compuestos químicos que se consideran disruptores endocrinos es muy amplio y crece día a día, comprendiendo desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos o en el medioambiente.

La capacidad de los contaminantes químicos medioambientales para interferir en la función endocrina fue establecida hace más de 30 años. El hecho inicial fue la constatación de que la población de pájaros piscívoros había declinado en los Estados Unidos debido a problemas reproductivos graves. Tales observaciones permitieron la

identificación del 4,4'-DDE, un metabolito del pesticida organoclorado DDT, como agente causante de las alteraciones reproductivas observadas (Hickey et al., 1968). El problema fue parcialmente resuelto con la retirada del pesticida en 1972, aunque como hemos visto sus residuos continúan estando presentes en el medioambiente, afectando por tanto a las poblaciones expuestas.

Otras observaciones medioambientales relacionadas con la exposición masiva de poblaciones animales, han ayudado a entender el problema de la disrupción hormonal. Los casos recogidos en la literatura científica son múltiples. Sirva de ejemplo lo ocurrido con la población de caimanes del lago Apopka en Florida, que se expusieron al pesticida dicofol tras un vertido accidental en 1980. Diez años más tarde, la población de caimanes había descendido significativamente, había aumentado la mortalidad en los huevos y la mitad de las crías nacidas languidecían y morían antes de los diez días; se encontraron, además, hembras adolescentes que tenían anomalías severas en los ovarios y presentaban niveles de estrógenos en sangre dos veces más altos de lo normal. Por otro lado, los caimanes jóvenes machos estaban fuertemente feminizados, presentaban penes anormalmente pequeños y tenían niveles de estrógenos más altos en su sangre que los normales. Las investigaciones llevadas a cabo sirvieron para concluir que los productos químicos que fueron vertidos al lago habían alterado el sistema endocrino de los embriones, limitando la capacidad de los caimanes para reproducirse y dando lugar a las malformaciones descritas (Guillette, Crain, Rooney, & Pickford, 1995).

En 1993, se publicó por primera vez la observación experimental relativa a los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces. En efecto, los peces machos capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentaron características sexuales masculinas y femeninas. Se observó también la producción de vitelogenina en el hígado de los peces macho, una proteína sintetizada normalmente por las hembras como respuesta a una señal estrogénica. Varias sustancias químicas, especialmente los alquilfenoles encontrados en detergentes y plásticos se identificaron como responsables de causar estos efectos feminizantes (Sumpter & Jobling, 1993).

Se ha documentado un fenómeno denominado *imposex*, que consiste en la superposición de caracteres sexuales masculinos sobre hembras de gasterópodos (Horiguchi et al., 1998). Se trata de uno de los pocos ejemplos de relación causa-efecto, dosis-dependiente, que se conocen en toxicología y resulta altamente específico ante la contaminación por TBT (tributilestaño, compuesto organoestánnico lixiviado de las pinturas

antialgas de los cascos de los buques). Durante el verano de 1996 se desarrolló una campaña de muestreo a lo largo de la costa de Galicia con el fin de estudiar la situación de la contaminación por derivados del TBT, escogiéndose como especie bioindicadora al prosobranquio marino *Nucella lapillus* por ser la segunda especie más sensible y en todas las muestras examinadas se registró la presencia de imposex en las poblaciones estudiadas (Quintela, Barreiro, & Ruiz, 2002).

Actualmente el conocimiento acerca de estas sustancias y sus mecanismos de acción es bastante grande, pero quedan aún grandes lagunas en la comprensión global de sus efectos sobre la salud del hombre y el resto de los seres vivos. En un principio se pensaba que los DE ejercían sus efectos principalmente a través de su unión con los receptores nucleares para hormonas, incluyendo los receptores de estrógenos (REs), los receptores de andrógenos (RAs), los receptores de progesterona (RPs), los receptores de hormonas tiroideas (RTs) y los receptores de retinoides, entre otros. Hoy en día la base científica de conocimiento sobre el tema ha aumentado y muestra que el espectro de mecanismos de acción es mucho mayor. Así se sabe que los DE actúan mediante su unión a los receptores nucleares, pero también a los receptores no nucleares (o de membrana) para hormonas esteroideas, receptores no esteroideos (p.e. receptores para neurotransmisores, como el receptor de serotonina, el receptor de dopamina o el receptor de norepinefrina), receptores huérfanos (p.e. el receptor de aril hidrocarburos [*AhR*]), rutas enzimáticas implicadas en la biosíntesis de esteroides y/o metabolismo, y numerosos otros mecanismos que convergen en la afectación de los sistemas endocrino o reproductivo.

Si bien la mayor parte de los efectos netos de los DE podrían catalogarse como “efectos estrogénicos”, lo cual ha motivado que durante tiempo se haya hablado de los DE como sinónimo de xenoestrógenos, existen numerosas sustancias que tienen efectos androgénicos o, más frecuentemente antiandrogénicos, y también como agonistas o antagonistas de las hormonas tiroideas.

El grupo de moléculas de origen antropogénico que han sido identificadas hasta el momento como DE es enormemente amplio y heterogéneo, e incluye desde sustancias plásticas o plastificantes (como el *Bisfenol A*), fungicidas (como la vinclozolina), fármacos (como el *dietilestilbestrol*, DES) y, por supuesto, gran parte de los *CTPs* incluidos en el Convenio de Estocolmo: *PCBs*, *dioxinas* y *furanos* así como muchos de los *POCs* (DDT, metoxicloro, clordano, entre otros). Incluso algunos *metales pesados* y metaloides pueden tener actividad estrogénica, por lo que también pueden ser incluidos como DE, y es

el principal motivo por el que, a pesar de no estar incluidos en el Convenio de Estocolmo, también hemos considerado su cuantificación en **LÍQUIDO FOLICULAR Y PELO** como uno de los objetivos en este trabajo de Tesis Doctoral.

Hay que destacar que no todos los DE son de origen antropogénico, sino que también existen en la naturaleza sustancias que han sido identificadas como DE, como los fitoestrógenos o el cumarol (Kuiper et al., 1998). Es presumible que una vez que se disponga de una batería adecuada de tests toxicológicos, útiles para explorar diferentes actividades hormonales, la lista de nuevos disruptores endocrinos se ampliará sustancialmente. De hecho los organismos nacionales e internacionales con intereses en la regulación y comercialización de compuestos químicos han lanzado la propuesta para la estandarización de estos tests y su aplicación sistemática a los compuestos de nueva creación y a aquellos preexistentes. Es ésta una tarea difícil y costosa si se tiene en cuenta que está previsto testar en los próximos años más de 100.000 moléculas químicas y que los test deben investigar actividades hormonales/antihormonales muy diversas. La lista de *mimetizadores hormonales* aumenta con la misma velocidad que se expande nuestro conocimiento sobre las formas de exposición a estas sustancias. Esto se debe de una parte al descubrimiento (muchas veces accidental) de la contaminación de muestras biológicas de origen animal y humano, y de otra, a la información disponible sobre utilización, uso y consumo de estos compuestos químicos.

Todas estas sustancias son, lógicamente, muy diversas desde un punto de vista químico, lo que representa un desafío en el campo de estudio de la disrupción endocrina, ya que, aparte de su pequeño tamaño (< 1000 Daltons), no parecen compartir otras características que hagan predecir si una molécula química va a comportarse como un DE o no. Sin embargo, en términos muy amplios, DE como por ejemplo las PCDDs/PCDFs, PCBs y POCs contienen grupos halogenados en su estructura (con sustituciones por átomos de cloro y bromo). Además, muchas de estas moléculas contienen un grupo fenólico que se piensa que es el responsable de conferirles similitud con las hormonas esteroideas, siendo así reconocidos como ligandos por los receptores de dichas hormonas, ya sea como agonistas o como antagonistas.

Ya hemos visto que las fuentes de contaminación y de exposición a estos compuestos que se comportan como DE son muy variables, pero pueden considerarse un fenómeno global que afecta a todos los seres vivos del planeta, que están expuestos de forma constante a mezclas, enormemente variables de individuo a individuo y de región en región,

de estas sustancias que fueron mayoritariamente diseñadas para ser persistentes. La situación es además cambiante, puesto que como ya sabemos, muchos de estos compuestos han sido prohibidos hace ya décadas, mientras que otros aún están permitidos para algunos usos o han sido prohibidos mucho más recientemente. La mayor parte de la exposición, como venimos comentando, viene a través de la ingesta de comida y agua. Evidentemente las personas que trabajan con pesticidas, fungicidas y sustancias químicas industriales tienen una exposición particularmente alta y por consiguiente mayores probabilidades de desarrollar anormalidades reproductivas o endocrinas

Hay una serie de consideraciones a tener en cuenta cuando se habla de disrupción endocrina, ya que pueden ser las claves para entender los mecanismos de acción y las consecuencias de la exposición a estas sustancias:

- *Edad de exposición:* A muchos de estos compuestos estamos expuestos durante toda nuestra vida, incluso antes de nacer, como lo demuestra el hecho de que hayan podido ser medidos en el líquido amniótico de mujeres gestantes (Luzardo et al., 2009). Las consecuencias de la exposición a los DE pueden ser muy diferentes dependiendo de la edad a la que se produzca. Es decir, que la exposición de un adulto a un DE puede tener consecuencias muy diferentes a la de un feto en desarrollo o un niño, siendo el desarrollo y la infancia los periodos más críticos a los efectos de los DE. Tanto es así que en la literatura científica se ha acuñado el concepto de “las bases fetales de las enfermedades del adulto” para describir la forma en que las sustancias presentes en el medio ambiente en el que se desarrolla un organismo (la madre en los mamíferos o el huevo en el resto de los vertebrados) interactúan con los genes del individuo para determinar su propensión a desarrollar una enfermedad o disfunción en el futuro. En términos más amplios la Endocrine Society ha extendido este concepto a la infancia, denominándolo "bases del desarrollo de las enfermedades del adulto" (Barker, 2003).

- *Latencia desde la exposición:* El concepto de las bases del desarrollo de las enfermedades del adulto lleva implícito el hecho de que existe un lapso de tiempo entre el inicio de la exposición y las manifestaciones clínicas de las consecuencias de la misma. En otras palabras: las consecuencias de la exposición a los DE pueden no aparecer inmediatamente ni de forma precoz en la vida, sino que pueden manifestarse con el transcurso del tiempo, muchos años incluso, durante la vida adulta (Barker, 2003).

- Importancia de las *mezclas*: Si los individuos y las poblaciones están expuestos a un determinado DE, es muy probable que lo estén a otros muchos de forma simultánea, ya que rara vez los ecosistemas están contaminados por un único compuesto. Esto tiene mucha relevancia de cara a los efectos clínicos, ya que, independientemente de los efectos que hayan podido ser demostrados en experimentos in vitro o in vivo, la presencia de otros contaminantes en las situaciones reales de exposición, puede inducir fenómenos de adición de efectos, pero también de sinergismo y de potenciación (Kortenkamp, 2007) (Kortenkamp, 2007).

- Relación de *dosis-respuesta no convencional*: Muchos de los efectos que ejercen los DE son paradójicos. Lo primero que llama la atención de estas sustancias, ya lo hemos comentado, es que, incluso a dosis infinitesimales, pueden producir anormalidades endocrinas o reproductivas, particularmente si la exposición tiene lugar en el periodo crítico del desarrollo. Pero lo sorprendente es que en algunos casos las dosis bajas pueden producir efectos más potentes que dosis más altas, dando lugar a curvas de dosis-respuesta en forma de “U” o de “U invertida” (Boada et al., 2007; vom Saal et al., 2007). Este fenómeno ya se conocía para algunas moléculas endógenas como los neurotransmisores.

- Efectos *epigenéticos transgeneracionales*: otra de las importantísimas características de los DE es que no sólo pueden afectar a la persona expuesta sino también a las generaciones subsiguientes. Los mecanismos no están claros, si bien investigaciones recientes sugieren que los mecanismos pueden ser no genómicos, es decir que no se transmitirían por una mutación en la secuencia de ADN, sino a través de modificaciones de factores que regulan la expresión génica, tales como la metilación del ADN o la acetilación de histonas.

Si bien en especies animales la asociación exposición-contaminación con DE y trastornos en el comportamiento, alteraciones en el desarrollo y riesgo de enfermedad, es un hecho probado, en la especie humana, tal relación necesita aún ser demostrada. No obstante existen algunos ejemplos que parecen evidenciar esta asociación (Leon-Olea et al., 2014; Vandegehuchte & Janssen, 2014).

Los datos epidemiológicos parecen demostrar que los desórdenes de carácter reproductivo se han incrementado durante los últimos cuarenta años. Desde 1940 se ha registrado una caída significativa, próxima al 50%, del recuento espermático en el hombre. Las alteraciones en el desarrollo del sistema genitourinario, como hipospadia y



criptorquidismo, asociado con cáncer de testículo y con infertilidad, son cada vez más frecuentes. Se ha sugerido la hipótesis de que la exposición a DE pudiera estar ligada al incremento de estas patologías.

En la mujer, el incremento de ciertas patologías asociadas con nuestro tiempo, como es el cáncer hormonodependiente, ya sea mama o endometrio, y el alza en la incidencia de los nuevos casos de esterilidad ligada a endometriosis, entre otras, podrían estar relacionados también con la exposición inadvertida a los disruptores endocrinos. De hecho, son múltiples los trabajos que con más o menos éxito han tratado de establecer la relación entre pesticidas organoclorados y cáncer de mama.

El problema de la exposición humana a los disruptores endocrinos y las consecuencias sobre salud puede ser investigado desde diferentes aspectos y con propósitos muy distintos. Resaltan, entre estas diferentes aproximaciones, los estudios clínico-epidemiológicos que tratan de establecer relaciones entre exposición a disruptores endocrinos y la frecuencia de presentación de una determinada enfermedad. Este proceso parece sencillo, pero requiere la definición de instrumentos para la medida de la exposición y de las variables que una vez cuantificadas permitan clasificar a los pacientes de acuerdo a su grado de exposición. La medida de exposición a disruptores endocrinos es, más que nada, compleja. De una parte porque la información sobre la producción, uso y aplicaciones de los compuestos químicos incluidos bajo esta denominación es muy escasa. De otra, porque no se dispone de tests adecuados para su identificación y catalogación ya que éstos solo se han desarrollado para actividades hormonales estrogénica y androgénicas. Además, porque la medida de compuestos químicos de forma aislada puede que no dé la información requerida sobre el efecto biológico que es necesario investigar.

Uno de los focos principales de estudio del efecto de los DE ha sido el sistema reproductivo femenino, dada la multitud de influencias hormonales que sobre él se ejercen y la complejidad de las mismas. Si bien los trastornos reproductivos femeninos se conocen muy bien desde el punto de vista clínico, anatomopatológico y de clasificación diagnóstica, en muchos casos el/los agentes etiológicos de dichas alteraciones no se conocen o existen importantes lagunas en la explicación completa de los procesos patológicos, lo cual es una limitación muy importante de cara al desarrollo de terapias efectivas. Cada vez hay mayor cantidad de estudios experimentales que atribuyen a los DE un papel relevante en el desarrollo de tales patologías. En la Tabla 14 presentamos algunos de los mejor conocidos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).



**Tabla 14.** Efectos de algunos DE sobre el sistema reproductor femenino

Compuesto	Animal expuesto y efectos	Mecanismo potencial
Vinclozolina	Feto de rata: desórdenes multisistémicos incluyendo tumores.	Alteración en la metilación del ADN en las células germinales. Disminución de la expresión de RE en el útero.
DES	Feto ratón: aumento de la susceptibilidad de cáncer en generaciones posteriores.	
DDT/DDE	Rata hembra inmadura: precocidad sexual.	Alteraciones en el eje neuroendocrino mediados por el RE y el AhR.
Bisfenol A	Inhibición del desarrollo de los conductos mamarios e inducción de la ramificación de los mismos.	Inhibición de la actividad apoptótica en la glándula mamaria. Aumento de la expresión de RP en las células epiteliales mamarias.
	Aumento de la densidad de la glándula mamaria.	
	Disminución del peso de la vagina. Estimulación endometrial.	Interferencias con la actividad de las sulfotransferasas. Activación no genómica del RE
PCBs	Pubertad precoz.	
	Feto de rata y ratas recién nacidas: Efectos neuroendocrinos a lo largo de 2 generaciones y cambios en el comportamiento.	Diversas acciones sobre el RE y los receptores de neurotransmisores.
Dioxinas	Feto de rata: Alteraciones en el desarrollo mamario y aumento a la susceptibilidad de padecer cáncer de mama.	Inhibición de la ciclooxigenasa 2 mediada por el AhR.
	Pubertad precoz.	
Ftalatos	Inhibición de la ovulación.	
	Telarquia prematura.	

Por otro lado, si bien las evidencias en humanos de alteraciones del sistema reproductivo masculino son muy limitadas, existen bastantes evidencias en animales de experimentación de los efectos adversos de los DE sobre este sistema (Tabla 15).

Por otra parte, la literatura también demuestra que los DE juegan un papel relevante en la etiología de enfermedades complejas como la obesidad, la diabetes mellitus o la enfermedad cardiovascular, si bien la dimensión de sus implicaciones son todavía poco conocidas. Aunque la evidencia es limitada, los datos apuntan a asignar un papel potencial de los DE, ya sea directa o indirectamente, en la patogenia de la adipogénesis y la diabetes, dos de las grandes epidemias del mundo moderno. Resulta evidente que se requiere mucha más investigación para aclarar todas las posibles interacciones entre las sustancias químicas presentes en el medio ambiente y la desregulación metabólica (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

**Tabla 15.** Efectos de algunos DE sobre el sistema reproductor masculino

Compuesto	Animal expuesto y efectos	Mecanismo potencial
Vinclozolina	Feto de rata: hipospadias, testículos no descendidos, retraso en la pubertad, enfermedad prostática en generaciones posteriores.	Alteración en la metilación del ADN en las células germinales.
DES	Feto de rata: hipospadias, criptorquidismo, retraso en la pubertad, aumento en la susceptibilidad al cáncer en generaciones posteriores.	Incremento de la expresión del ER en el epidídimo. Reducción en los niveles de IGF- 3.
DDT	Rata adulta: disminución en la fertilidad.	
Bisfenol A	Rata: aumento en el tamaño de la próstata, desarrollo aberrante de la próstata y uretra, cáncer de próstata.	Aumento de la expresión de RE en el hipotálamo. Aumento de la expresión de RA en la próstata.
PCBs	Feto de rata: disminución en la espermatogénesis, retraso en la pubertad.	
Ftalatos	Rata: disminución en la distancia anogenital, criptorquidismo, oligospermia.	Disminución en la síntesis de testosterona.

En tanto en cuanto se van dilucidando todas estas cuestiones, lo que es innegable es la preocupación sobre los efectos en salud humana de estas sustancias, y ante las grandes lagunas que existen sobre la dimensión real de sus efectos, la necesidad de que las autoridades en materia de salud pública articulen todas aquellas medidas necesarias para disminuir la exposición a las mismas, basándose siempre en el principio de precaución, ya que en aquellos casos en los que así se ha hecho, la experiencia y el tiempo han demostrado la certeza en su aplicación. Optar por el principio de precaución en las decisiones relativas a la exposición humana a los disruptores endocrinos significa actuar de forma preventiva cuando se encara la incertidumbre.

### 1.11.3. Contaminantes tóxicos persistentes.

Los CTPs son sustancias químicas o subproductos que poseen riesgos muy significativos para la salud humana o de los ecosistemas, y que debido a su resistencia a la degradación, permanecen durante largos periodos de tiempo en el medioambiente. Se trata de sustancias altamente liposolubles por lo que son capaces de bioacumularse en los tejidos humanos, animales o vegetales. Debido a esta **BIOACUMULACIÓN** las concentraciones

medibles de estas sustancias aumentan según se suben peldaños en la cadena alimentaria, en un fenómeno conocido como **BIOMAGNIFICACIÓN** (Gray, 2002).

Los criterios que debe cumplir un contaminante químico para ser considerado un CTP son:

- Ser extremadamente estable y persistente en el medioambiente.
- Bioacumularse en los organismos vivos y en la cadena alimentaria.
- Ser tóxico para el ser humano y los animales y tener efectos crónicos sobre la salud tales como disrupción de los sistemas endocrino, inmune o reproductivo, y/o ser carcinogénicos.
- Ser transportados en el medioambiente a grandes distancias del punto donde fueron liberados.

Como consecuencia de todas estas características, muchas especies, y en particular las situadas en los eslabones más altos de la cadena trófica, están crónicamente expuestas a estas sustancias, incluso durante toda la vida (Luzardo et al., 2009). De esta manera los CTPs pueden alcanzar niveles muy altos en, por ejemplo, las focas y osos polares (Braune et al., 2005; Leonards et al., 2008) (Braune & Malone, 2006; Leonards, van Hattum, & Leslie, 2008). Al ser sustancias muy liposolubles, los alimentos de origen animal ricos en grasas como los productos lácteos, las carnes o pescados grasos como el salmón, el arenque y la anguila, tienen concentraciones más altas que los alimentos de origen vegetal o bajos en grasas (Brustad, Sandanger, Nieboer, & Lund, 2008).

Algunas poblaciones humanas, como los inuit (o esquimales) que comen alimentos extremadamente grasos como salmón y foca, ingieren niveles de estos compuestos muy superiores a la ingesta diaria admisible (IDA) establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Una sola comida puede contener tanto como 100 veces la IDA (Bonefeld-Jorgensen et al., 2006). Los bebés lactantes (o personas con un consumo excesivo de productos lácteos) también podrían llegar a superar fácilmente el valor de IDA (Trapp, Bomholtz, & Legind, 2008). Como veremos, los efectos adversos sobre la salud de los CTPs pueden ser muy graves, incluidos los efectos nocivos sobre la fertilidad y el desarrollo embrionario, el daño al sistema nervioso (incluyendo el aprendizaje intelectual y deterioro de la función cognitiva) o el cáncer, por citar sólo algunos de los más graves (Ovesen et al., 2014).

En principio, un CTP liberado en cualquier parte del mundo puede con el tiempo llegar a alcanzar cualquier otro lugar del planeta. Sin embargo, en términos generales se produce una redistribución a gran escala de los CTPs desde las zonas más templadas a las zonas más frías del planeta, debido a un fenómeno que ha dado en llamarse “efecto saltamontes”. Básicamente los CTPs se propagan por evaporación a la atmósfera desde las regiones más templadas del planeta - los países tropicales, que es precisamente donde más se utilizan - a los más fríos, donde se depositan por condensación, de la misma manera que el vapor de agua del aire se condensa en forma de rocío en una noche de verano. De esta manera, estos compuestos pueden viajar miles de kilómetros desde el lugar en que son emitidos (Scheringer, Jones, Matthies, Simonich, & van de Meent, 2009). Los riegos de los denominados CTPs fueron reconocidos por vez primera en 1978 por los gobiernos de los Estados Unidos y Canadá en el Acuerdo para la Calidad del Agua de los Grandes Lagos (Davies, 2006). Desde entonces se han desarrollado numerosas estrategias nacionales o regionales para minimizar los riesgos de los CTPs, que ya son considerados como una categoría química en sí misma.

Otro problema con el que se encuentran en muchos países tropicales es el de las graves enfermedades que son transmitidas por determinados insectos. Así el DDT ha sido recomendado como parte esencial del arsenal de insecticidas disponibles para la fumigación de interiores mientras no haya otras alternativas igual de eficaces para el control de los vectores de enfermedades tan graves como la malaria. 14 países usan actualmente el DDT para el control de la diseminación de enfermedades y otros tantos están planteándose reintroducirlo (H. van den Berg, 2009).

De todo lo expuesto se deduce que, mientras en algunas regiones del mundo se sigan utilizando, los CTPs encontrarán su acomodo en el medioambiente y permanecerán en él durante largo tiempo. Incluso si la producción de estas sustancias cesara de inmediato a escala global, el problema seguiría existiendo durante varios años o quizá décadas. Quiere esto decir que ningún país puede solucionar el problema de los CTPs por sí sólo. Debido a que estas sustancias son “emigrantes sin pasaporte” las regulaciones nacionales necesitan apoyarse en acuerdos y medidas globales para poder resolver el problema.

Por este motivo, en el marco del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) el 23 de mayo de 2001 se elabora el conocido como Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (2001). A este Convenio se adhirieron en principio unas 90 naciones, incluyendo entre ellas a España (United Nations

Environment Programme, 2001). Como veremos en el siguiente apartado en este Convenio se habla exclusivamente de compuestos de naturaleza orgánica, y es que cuando se habla de CTPs deben considerarse por separado aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura molecular, llamados contaminantes orgánicos persistentes (COPs) de aquellos cuya naturaleza es inorgánica (básicamente, metales y metaloides), que en esta Tesis Doctoral denominaremos contaminantes inorgánicos persistentes (CIPs). En esta introducción también los consideraremos por separado.

#### **1.11.3.1. Contaminantes orgánicos persistentes**

Bajo el Convenio de Estocolmo, los países firmantes confían en reducir y/o eliminar la producción y el uso de los CTPs. Con el fin principal de reducir y/o eliminar los COPs.

Así, la lista de COPs que se consideran actualmente es la siguiente:

- En el Anexo A – Sustancias que deben ser eliminadas (las partes deben tomar medidas para eliminar la producción y el uso las sustancias listadas en este anexo) se incluyen plaguicidas (aldrina, clordano\*, clordecona, dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorociclohexano\*, mírex, hexaclorobenceno y toxafeno\*) y productos químicos industriales (hexabromodifenileter y heptabromodifenileter, PCBs\*, hexaclorobenceno, pentaclorobenceno, tetrabromodifenileter y pentabromodifenileter).
- En el Anexo B – Sustancias de uso restringido (las partes deben tomar medidas para restringir la producción y el uso de las sustancias incluidas en esta lista) se incluyen plaguicidas (DDT\*) y productos químicos industriales (sulfonatos de perfluorooctano, PFOS y PFOA).
- En el Anexo C – Disminución de las emisiones de sustancias de producción no intencionada (las partes deben tomar medidas para reducir la liberación de los productos químicos enumerados con el objetivo de minimizar la continuación de los mismos, y, cuando sea factible, la eliminación de dicha liberación) se incluyen subproductos industriales no intencionados (PCDD\*, PCDF\*, HCB, pentaclorobenceno y PCBs\*).

\* Tanto el clordano, como el DDT, Hexaclorociclohexano, PCBs, PCDD, PCDF y el Toxafeno son mezclas de congéneres, en ocasiones cientos de ellos.

A día de hoy, hay otras sustancias químicas que han sido propuestas para ser incluidas en el Convenio y están bajo revisión. Este es el caso, por ejemplo, de las parafinas cloradas de cadena corta, el plaguicida endosulfán y el compuesto industrial, hexabromociclododecano.

Es de destacar que el Convenio de Estocolmo recoge también la necesidad de realizar acciones tendentes a verificar la efectividad de las medidas propuestas para la reducción/eliminación de los COPs. Así, el artículo 11.1.b. del Convenio expone que: “las partes (países firmantes del convenio) alentarán y/o efectuarán las actividades de investigación, desarrollo, vigilancia y cooperación adecuadas respecto de los COPs y su presencia, niveles y tendencias en las personas y el medio ambiente”, lo que se traduce, en la justificación de la determinación y cuantificación (monitorización) de estos COPs en alimentos, matrices ambientales y seres vivos incluyendo los seres humanos.

De cara a facilitar la descripción de las características de los COPs, abordaremos su estudio por separado, dividiéndolos en: 1) Plaguicidas organoclorados y 2) Dioxinas y compuestos análogos.

### **1) Plaguicidas organoclorados**

Bajo el nombre de plaguicidas organoclorados (**POCs**) se agrupa un número considerable de compuestos sintéticos cuya estructura química, en general, corresponde a la de los *hidrocarburos clorados*, aunque, además de cloro, algunos de ellos poseen oxígeno o azufre o ambos elementos en su estructura. Los compuestos organoclorados fueron los primeros insecticidas orgánicos utilizados a gran escala. Entre sus propiedades destacan su reducida volatilidad, alta estabilidad química y solubilidad en lípidos, lenta biotransformación y degradación en el medio ambiente, así como una notable resistencia al ataque de los microorganismos (Matsumoto, Kawanaka, Yun, & Oyaizu, 2009)). Estas propiedades, que les hacían enormemente atractivos, son también las que en última instancia han provocado su prohibición en numerosos países, pues constituyen el fundamento de los problemas que plantean al medio ambiente: persistencia, bioacumulación y biomagnificación en seres vivos (animales y humanos), transporte de largo alcance y toxicidad, características propias y comunes de todos los COPs y que llevaron a la inclusión de la mayoría de estos plaguicidas en el Convenio de Estocolmo.

Hay que destacar que las restricciones impuestas en el uso de estos compuestos organoclorados se han traducido en un marcado descenso en la concentración

media de estos plaguicidas en tejidos humanos, como pone de manifiesto el caso del DDT. En la década de 1960, la concentración media en tejido adiposo en los habitantes de Estados Unidos era de 5 ppm, mientras que en 1990 se encontraba ya a niveles unas 100 veces inferiores. Sin embargo, estudios recientes realizados en nuestro país demuestran que, 35 años después de su prohibición, aún es posible medir su principal metabolito, el DDE, en la sangre de la práctica totalidad de los individuos adultos sanos y el DDT en cerca del 30% de la población (Jakszyn et al., 2009), e incluso en el líquido amniótico (Luzardo et al., 2009). No es sorprendente, no obstante, ya que como comentamos en el apartado anterior su uso persiste, o incluso ha sido reintroducido tras un periodo de prohibición, en países en vías de desarrollo, donde desempeñan un importante papel como agentes de control de organismos vectores (malaria en algunos países de África y Sudamérica) y aún como insecticida de uso agrícola.

Al igual que el resto de COPs considerados en este apartado, la tendencia a la biomagnificación y persistencia ambiental de los insecticidas organoclorados hace que estén sujetos a amplios ciclos de transporte en toda la biosfera. De esta forma, se han encontrado niveles relativamente altos de un cóctel de insecticidas organoclorados en el tejido adiposo de humanos y también animales como focas, morsas, ballenas y peces capturados en el círculo polar ártico (Leonards et al., 2008).

Entre 1954 y 1961, en Sheldon (Estados Unidos), se pulverizaron las tierras con DDT para acabar con una invasión de escarabajo japonés, y con ello se inició un proceso de fatales consecuencias. Los escarabajos medio muertos atrajeron a los pájaros insectívoros, la lluvia arrastró los componentes químicos, los cuales afectaron a las lombrices y contaminaron los charcos donde bebían diferentes aves. Ardillas, ratas almizcleras, conejos o zorras tigrillo fueron los siguientes en morir. Los pájaros que sobrevivieron quedaron estériles, ya que el DDT impide que la cáscara de los huevos se endurezca, con lo que se rompían antes de su ciclo natural. Los gatos desaparecieron. A medida que el DDT iba escalando niveles tróficos, aumentaba su concentración en tejidos animales. Por primera vez se habló del peligro de usar DDT y otros productos químicos usados como plaguicidas. Lo más alarmante no era únicamente su toxicidad, sino también su capacidad para persistir en los organismos por medio de la acumulación en los tejidos grasos, lo cual originó un amplio debate que condujo finalmente a la prohibición del uso del DDT y muchos otros insecticidas organoclorados en muchos países, así como su inclusión



en todas las listas de regulación de CTPs que se han ido promulgando y, por supuesto, si bien con un retraso de 40 años, finalmente en el Convenio de Estocolmo.

#### ▪ **Clasificación y propiedades físico-químicas**

Atendiendo a su estructura, modo de síntesis u otras propiedades comunes a un grupo de ellos, se han propuesto varias clasificaciones para los insecticidas organoclorados. Nosotros presentamos la clasificación y las propiedades físico-químicas de los más utilizados, según su estructura química (McCarty & Borgert, 2006):

- *Compuestos poliaromáticos clorados* (DDT, Dicofol, Metoxicloro, Clorobencilato). El DDT es prácticamente insoluble en agua a 25°C. Sin embargo es de moderadamente soluble a soluble en numerosos disolventes orgánicos, tales como hidrocarburos aromáticos, alifáticos, cetonas y alcoholes. Su presión de vapor es baja ( $1,9 \times 10^{-7}$  mm Hg a 20°C) por lo que se considera no volátil, pero puede pasar al aire a partir del suelo de manera continua, sobre todo en presencia de agua. En presencia de luz ultravioleta, el DDT pierde HCl y se transforma en DDE, compuesto que carece de acción insecticida, pero conserva todo el resto de propiedades. El resto de los plaguicidas poliaromáticos clorados tienen características similares a las del DDT.

- *Cicloalcanos clorados* (Hexaclorociclohexano). El hexaclorociclohexano técnico (HCH) es una mezcla de 8 isómeros, entre los cuales el isómero conocido como gamma HCH o lindano está presente en una proporción del 10-18%. Es precisamente este isómero el que le confiere las propiedades insecticidas a la mezcla, pues los demás isómeros del HCH apenas poseen efecto tóxico agudo sobre los insectos y otros organismos. Debe mencionarse, sin embargo, que hay numerosos estudios que identifican al isómero beta HCH como promotor del cáncer de mama (Wong & Matsumura, 2007). El lindano (gamma HCH) es moderadamente soluble en agua (10 mg/L) y más soluble en acetona, cloroformo y etanol. Su presión de vapor es baja ( $9,4 \times 10^{-6}$  mm Hg a 20°C). Es estable a la acción de la luz solar, del oxígeno del aire, del calor y de los ácidos concentrados. Sin embargo, en medio alcalino se descompone y libera con facilidad ácido clorhídrico.

- *Compuestos ciclodiénicos clorados* (Aldrina, Dieldrina, Endrina, Heptacloro, Endosulfán, Clordano, Mirex, Clordecona). El clordano técnico es una mezcla de diferentes hidrocarburos clorados, estrechamente relacionados por sus estructuras: en teoría contiene 70% de cis-clordano, 25% de trans-clordano, 1% de heptacloro y el 4% restante de una mezcla de otros compuestos. Su volatilidad es intermedia entre la del lindano y la del DDT.



Es prácticamente insoluble en agua y soluble en éteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Es relativamente estable ante los ácidos, mientras que en medio alcalino libera ácido clorhídrico con facilidad.

De manera similar, el *heptacloro* y el *endosulfán* tienen limitada solubilidad en agua: se disuelven preferentemente en cloroformo, tetracloruro de carbono, xileno y otros disolventes orgánicos y son moderadamente solubles en etanol. Son estables ante la humedad, el aire y el calor y no se degradan por la acción de la luz ultravioleta. El heptacloro es moderadamente estable en presencia de agua, ácidos, bases y agentes oxidantes. En el ambiente se transforma para dar su epóxido, el cual es todavía más estable. El endosulfán es sensible a los ácidos y a las bases y, en presencia de agua, se hidroliza, dando lugar a endosulfandiolo, el cual carece de acción insecticida.

La *aldrina* tiene un punto de fusión entre 104 y 104,5°C y una presión de vapor baja ( $7.5 \times 10^{-5}$  mm Hg a 20°C). Es muy poco soluble en agua. Este compuesto es estable ante los ácidos débiles, las bases y el calor y es sensible a la acción de la luz ultravioleta. En presencia de ácidos fuertes y tras su biotransformación en los seres vivos se transforma en dieldrina, la cual es mucho más estable. La dieldrina y endrina poseen características físicoquímicas similares a las de la aldrina.

El *mírex* forma cristales incoloros con un punto de fusión de 485°C y una presión de vapor muy baja. Es prácticamente insoluble en agua, pero moderadamente soluble en benceno, tetracloruro de carbono, xileno y otros disolventes orgánicos. En condiciones ambientales es extremadamente estable y persistente. La clordecona es muy similar al mirex.

- *Terpenos clorados* (Canfeclor). El canfeclor, más conocido por su primer nombre comercial toxafeno, tiene un contenido de cloro del orden del 67-69%. El número de productos químicos individuales que forman parte del toxafeno así como sus estructuras es desconocido. No tiene un punto de fusión definido, su presión de vapor de 0.2-0.4 mm de Hg a 25°C, es la más elevada de los POCs. Al igual del resto de los POCs es poco soluble en agua. Se descompone por la acción de la luz solar, liberando ácido clorhídrico.

- *Bencenos policlorados* (pentaclorobenceno, hexaclorobenceno). El hexaclorobenceno es un sólido blanco cristalino que no ocurre en forma natural en el medio ambiente. Tiene un punto de fusión de 231°C y una presión de vapor de 0.1 mm Hg a 20°C. Es prácticamente insoluble en agua y muy soluble en disolventes orgánicos, como hexano,

benceno, cloruro de metileno, etc. En condiciones ambientales es extremadamente estable y persistente. Además de haber sido utilizado hasta el año 1965 como plaguicida, se forma espontáneamente a partir de otros compuestos orgánicos policlorados, como subproducto industrial y en la combustión de residuos sólidos urbanos. El pentaclorobenceno tiene unas características muy similares a las del hexaclorobenceno.

Como comprobamos, todos los insecticidas organoclorados comparten varias características físicoquímicas, principalmente su *liposolubilidad*, la *estabilidad química* y sobre todo su *elevada resistencia a la degradación*.

#### ▪ Estado actual del uso de los POCs

Desde principios de los años 70 un país tras otro ha ido restringiendo o prohibiendo el uso de la mayor parte de los POCs, a menudo con el DDT como única excepción para el control de vectores de enfermedades infecciosas, principalmente la malaria. En la Tabla 10 recogemos un resumen de los últimos usos registrados de los POCs (UNEP/FAO/WHO, 2002). Los datos sobre el uso real actual de determinados plaguicidas son muy difíciles de obtener y en ocasiones los que hay ofrecen poca fiabilidad.

El lindano, el clordano (también denominado kepona) y el endosulfán son los últimos COPs incorporados a la lista del Convenio de Estocolmo. El lindano aún sigue siendo utilizado para aplicaciones farmacéuticas en el control de sarna y piojos como tratamiento de segunda elección, aunque uno de los principales problemas que ha presentado su producción es la ineficacia del proceso, ya que por cada tonelada de lindano producida, se generan de 8 a 10 toneladas de los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  del hexaclorociclohexano, también incluidos en dicha lista. El Clordano dejó de utilizarse prácticamente al mismo tiempo que el DDT pero, junto con el lindano, no formaron parte de la lista hasta el 2009. Finalmente el endosulfán, utilizado en muchos países para el control de plagas agrícolas, preservación de la madera, jardinería, control de la mosca tse-tse, etc, dejó de utilizarse en España en enero de 2008.

#### ▪ Parámetros Toxicocinéticos

Como ocurre con todas las sustancias químicas, la toxicidad de los organoclorados depende de la absorción, distribución, metabolización y eliminación:

- *Absorción*. Los POCs (con algunas excepciones) pueden ser absorbidos de forma tópica u oral de forma muy rápida debido a la alta liposolubilidad de estos

compuestos. Actualmente, la vía principal de exposición a estos compuestos es la oral, a través de los alimentos, principalmente los más ricos en grasas animales. Como hemos visto, los POCs no son altamente volátiles, así que la inhalación no es una ruta normal de exposición

- *Distribución.* En el organismo, la distribución de los POCs se hace al hígado, riñón, cerebro y principalmente al tejido adiposo (Tao et al., 2009). En el medioambiente, al igual que todos los hidrocarburos tratados con cloro, lo que les confiere una alta liposolubilidad, se distribuyen igualmente a los tejidos grasos de los seres vivos; consecuentemente ocurre la bioacumulación en la cadena alimentaria, y por consiguiente en animales y seres humanos (Pandit, Sahu, & Sadasivan, 2002).

- *Metabolización.* Los compuestos poliaromáticos clorados, tales como el DDT, son dechlorinados mediante oxidasas de función mixta (MFOs), si bien no todos con la misma eficacia. Así, el metoxicloro es rápidamente eliminado comparado con el DDT por dechloración y oxidación. Los ciclodienos tales como la endrina son rápidamente convertidos en epóxidos mediante las MFOs. Los bencenos policlorados, como el pentaclorobenceno experimentan glucuronidación y sulfoconjugación. Como vemos, existen varias rutas de biotransformación de los POCs, pero en general, salvo algunas excepciones como es el caso del lindano, la degradación metabólica de estos plaguicidas tiene lugar muy lentamente, debido a la presencia de múltiples átomos de cloro como sustituyentes, muy difíciles de eliminar por mecanismos enzimáticos, y a las estructuras aromáticas complejas que presentan algunos de estos compuestos. El lento ritmo de metabolismo junto con la elevada liposolubilidad dan lugar al almacenamiento prolongado en el tejido adiposo, del que se movilizan muy lentamente para restaurar el equilibrio entre tejidos y sangre a medida que progresa la transformación metabólica y la excreción.

- *Excreción.* La mayor ruta de excreción de los organoclorados es mediante la bilis al tracto digestivo y consecuentemente puede ocurrir la recirculación enterohepática. Los metabolitos son también lipofílicos, con lo que se almacenan en el tejido adiposo y pueden distribuirse nuevamente. La vida media de algunos difenilalifáticos tales como el DDT y los ciclodienos puede ser desde varios días hasta varios meses/años. La eliminación puede a veces ser explicada por un modelo de dos compartimentos, donde la primera fase es una eliminación rápida y la segunda, una eliminación más prolongada (Tanabe & Kunisue, 2007).

## ▪ Mecanismo de acción

Cuando hablamos del mecanismo de acción tóxica de los POCs hay que distinguir claramente entre el mecanismo que produce la *toxicidad aguda*, responsable de la amplia utilización que durante décadas han tenido estos compuestos en el control de plagas, de los mecanismos de *toxicidad a largo plazo*, comunes además a gran parte del resto de CTPs, que se producen tras la exposición inadvertida a bajas concentraciones de estos compuestos durante toda la vida, como ya hemos visto a través de la dieta principalmente. Consideraremos en este apartado, de forma breve, únicamente los bien conocidos mecanismos de toxicidad aguda de los POCs, ya que los efectos atribuibles a la exposición crónica caen dentro del concepto de *disrupción endocrina* y que responden a mecanismos extremadamente complejos sometidos a múltiples variables dependientes del individuo y de la presencia de otras sustancias químicas como vimos anteriormente.

Así hay varios mecanismos de toxicidad aguda de los POCs. Un mecanismo común a todos ellos es la interferencia con el arco reflejo que se establece entre los nervios sensoriales, el sistema nervioso central y los nervios motores, que activan la respuesta muscular a los estímulos externos (Mariussen & Fonnum, 2006). En insectos o mamíferos intoxicados por acción del DDT o compuestos similares, se observan temblores y convulsiones persistentes, lo que sugiere una descarga repetida de las neuronas. El estudio de la conducta eléctrica de las fibras nerviosas muestra que los POCs inducen un alargamiento considerable de la fase descendente del potencial de acción, manteniendo así a la membrana de la neurona en un estado parcialmente despolarizado, muy susceptible a una nueva despolarización total ante los menores estímulos. Esta modificación del comportamiento eléctrico de las células nerviosas se produce por varios mecanismos. Por una parte, afecta a la permeabilidad de la membrana de las células nerviosas, lo que reduce el transporte de iones potasio. Por otra, los POCs modifican la funcionalidad los canales porosos por los que circulan los iones sodio, de forma que su apertura se produce rápida y normalmente, pero se dificulta su cierre, que tiene lugar más lentamente que en ausencia de este compuesto. Por consiguiente, interfiere con el transporte activo de sodio hacia el exterior del axón durante la repolarización (Mariussen & Fonnum, 2006). El DDT, además, inhibe la *calmodulina*, necesaria para el transporte de iones calcio, a su vez imprescindible en la secreción de neurotransmisores en la sinapsis. También inhibe la *adenosina trifosfatasa (ATPasa)* de las neuronas, en particular las bombas de sodio, potasio y calcio, esenciales en la repolarización.

Los clorobencenos, clorociclohexanos y clorociclodienos también son inhibidores potentes de las *bombas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>* en las membranas de las neuronas, provocando potenciales de acción disminuidos (Mariussen & Fonnum, 2006). Pero estos plaguicidas actúan también por estimulación del sistema nervioso central, ya que son *antagonistas del ácido γ-aminobutírico (GABA)*, con lo que bloquean el paso de iones cloruro inducido por este neurotransmisor. El mecanismo inhibitorio de GABA explica los efectos colinérgicos (sobreestimulación mediada por la acetilcolina) de la dieldrina y del lindano en varias especies. A diferencia del DDT, para el que existen pocos casos de intoxicación con resultado de muerte, los clorociclodienos han sido causantes de numerosas muertes, además de ser muy persistentes y tóxicos para el medio ambiente. Se absorben rápida y eficazmente por vía cutánea, lo que contribuye a la mayor toxicidad que se ha observado en exposiciones ocupacionales.

Además de los efectos sobre el sistema nervioso ya comentados, la exposición a lindano y al llamado lindano técnico (una mezcla de todos los isómeros del HCH) produce efectos tóxicos sobre el *hígado* y los *túbulos renales*, aunque se desconoce el mecanismo de toxicidad sobre estos órganos.

#### ▪ Toxicidad

Al igual que comentamos en el apartado anterior, hay que distinguir claramente entre los efectos tóxicos agudos de los POCs, producidos tras la exposición habitualmente única a dosis elevadas, de los efectos crónicos de una exposición a dosis muy bajas pero durante periodos de tiempo muy largos, que pueden abarcar toda la vida.

Los efectos tóxicos agudos de los POCs, al igual que ocurre con el resto de productos plaguicidas, han sido clasificados como primarios y secundarios. El efecto primario es aquel por el cual el plaguicida actúa directamente sobre una especie dada, matándola o reduciendo sensiblemente su población. El efecto es secundario si el plaguicida no actúa directamente sobre la especie, pero destruye su sustrato o su hábitat y la pone seriamente en peligro de desaparición.

## 2) Dioxinas y compuestos análogos

Bajo el nombre genérico de dioxinas y compuestos análogos se engloba a un grupo de sustancias químicas complejas que se caracterizan por tener varios aspectos en

común, entre ellos, contener cloro en sus moléculas y una alta liposolubilidad, lo que las convierte en sustancias estructural, ambiental y biológicamente persistentes, además de acumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica (Van den Berg et al., 2006). Además, las dioxinas son ampliamente conocidas por su potente capacidad carcinogénica, estando incluidas en el Grupo I de sustancias de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC).

#### ▪ Clasificación y propiedades físico-químicas

Dentro de este complejo grupo nos podemos estar refiriendo a 4 tipos de sustancias: (1) Dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) o dioxinas propiamente dichas, (2) Dibenzofuranos policlorados (PCDFs) o furanos, (3) Bifenilos policlorados (PCBs) y (4) Bifenilos polibromados (PBBs), aunque debido a la relativamente corta vida comercial de éstos últimos y la restringida distribución ambiental de los mismos, habitualmente se les excluye de la consideración toxicológica de “análogos a las dioxinas” y no serán descritos en apartados posteriores. Nosotros en esta Tesis Doctoral las agruparemos en dos:

- Las **dioxinas** (PCDDs/PCDFs) son un grupo amplio y estructuralmente relacionado de hidrocarburos aromáticos clorados (Institute of Medicine (U.S.). Committee on the Implications of Dioxin in the Food Supply, e Institute of Medicine (U.S.), 2003). Teóricamente existen 210 congéneres posibles dentro de este grupo: 75 dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) y 135 dibenzofuranos policlorados (PCDFs). Las 75 PCDDs, están formadas por dos anillos de benceno unidos a su vez por dos átomos de oxígeno y en su molécula pueden contener de cuatro a ocho átomos de cloro. El prototipo de dioxina está representado por el congénere más tóxico de todos, la 2,3,7,8 tetraclorodibenzodioxina (**TCDD**). Los 135 PCDFs se componen de dos anillos de benceno pero en este caso, los anillos están unidos por un solo átomo de oxígeno. Cada anillo tiene cuatro sitios disponibles para la unión de los átomos de cloro.

Se trata de microcontaminantes de origen antropogénico ampliamente distribuidos en el medio ambiente. No tienen uso alguno, pero se forman espontáneamente en multitud de procesos industriales, como la manufactura de ciertos productos químicos, procesos industriales como la fabricación de PVC, la incineración de residuos sólidos urbanos o el blanqueo de la pulpa de madera en la fabricación de papel. Son sustancias químicamente muy estables y resistentes a la degradación (tanto química como bacteriana)

y, por lo tanto, persistentes en el medioambiente. Es decir, que cumplen todas las características para ser incluidas en todos los listados de CTPs y, por supuesto en el Convenio de Estocolmo sobre COPs.

- Los **bifenilos policlorados (PCBs)** son una serie de compuestos organoclorados, que constituyen una serie de 209 congéneres, los cuales se forman mediante la cloración de diferentes posiciones del bifenilo, 10 en total. Cada posición puede ser sustituida por un átomo de cloro. Si las posiciones 2, 2', 6 y 6' no tienen ningún cloro los bifenilos se mantienen coplanares, hablando por tanto de PCBs coplanares o no-orto. Si tenemos una posición sustituida en cada lado, son PCBs mono-orto sustituidos, y el resto son los PCBs no coplanares. Su fórmula empírica es  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , donde n puede variar entre 1 y 10, siendo mayoritarios los congéneres con 2 a 7 cloros.

Los PCBs coplanares y los mono-orto sustituidos son los que tienen mayor importancia medioambiental y analítica debido a que su toxicidad puede ser asimilada a la de las PCDDs/PCDFs, posiblemente debido a la coplanaridad de la molécula (Schechter, Birnbaum, Ryan, & Constable, 2006), y son los que denominamos “compuestos análogos a las dioxinas” (DL-PCBs, de la denominación anglosajona dioxin-like PCBs).

Las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos también dependen del grado de cloración y de si son no-orto, mono-orto o no coplanares. Así, la presión de vapor disminuye con el grado de cloración, y lo mismo con su estabilidad en el medio ambiente. El periodo de semivida puede variar desde 10 días a un año y medio; por lo general, estos compuestos son termoestables (punto de ebullición de 320-420°C), no los ataca la luz y son difícilmente biodegradables. Son ligeramente solubles en agua y muy liposolubles, por lo que se disuelven en su mayor parte de disolventes orgánicos (Schechter et al., 2006).

Debido a sus características físico-químicas como son su alta estabilidad, inercia y características dieléctricas, que eran ventajosas para muchos propósitos industriales, los PCBs fueron utilizados para una gran variedad de usos; en sistemas cerrados tales como transformadores eléctricos, condensadores y sistemas de traspaso térmico (en todos ellos como retardantes de llama para evitar el incendio de dichos aparatos), así como también, en sistemas hidráulicos. Durante un tiempo, los PCBs también tuvieron otra variedad de usos, puesto que fueron utilizados en formulaciones de pinturas, polímeros, pegamentos, lubricantes, plastificantes, formulaciones de plaguicidas y como agentes para la suspensión de pigmentos en el papel de copia sin carbón.



Los PCBs, PCDDs y PCDFs son eliminados de la atmósfera mediante procesos físicos tales como deposiciones secas o húmedas, absorción de vapores y depósitos en suelos, aguas superficiales y superficies de plantas. La mayor parte PCBs, PCDDs y PCDFs que se depositan en las aguas superficiales se absorben sobre los sedimentos suspendidos en el agua. Una vez unidos al suelo y al sedimento, estos químicos quedan, generalmente ahí fijados, a excepción del transporte a granel debido a la erosión del suelo (Dickson & Buzik, 1993).

#### ▪ **Parámetros toxicocinéticos**

Dada la importancia de los efectos tóxicos de estas sustancias, la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de las dioxinas y los compuestos análogos han sido estudiadas en profundidad (Van den Berg, De Jongh, Poiger, & Olson, 1994):

- *Absorción.* Debido a la alta liposolubilidad de estos compuestos la absorción es eficaz por todas las vías. No obstante, como veremos más adelante, la principal vía de exposición es la oral, a través de los alimentos, siendo la absorción por el resto de vías prácticamente despreciable. La absorción gastrointestinal puede exceder el 75% de la dosis ingerida para los congéneres tratados con cloro en porcentajes más bajos. El incremento del tamaño molecular (proporcional al número de sustituciones con cloro) reduce significativamente la absorción intestinal, estimándose la absorción de los compuestos con 8 átomos de cloro de tan solo un 2-10%.

- *Distribución.* Las dioxinas y compuestos análogos se distribuyen extensa y eficazmente por el organismo. Una vez absorbidos alcanzan fácilmente el compartimento central y se distribuyen principalmente unidos a los quilomicrones, lipoproteínas y otras proteínas plasmáticas. El hígado y de forma muy relevante el tejido adiposo son los principales sitios de depósito de estos compuestos en la mayor parte de las especies. En algunas especies son también relevantes como sitios de almacenamiento la piel y las glándulas suprarrenales. La transferencia placentaria de PCDDs/PCDFs y PCBs depende, al igual que para la absorción, del tamaño molecular. Los compuestos con menor cantidad de átomos de cloro como el 2,3,7,8-TCDD son altamente retenidos en el feto. En muchas especies de mamíferos, la transferencia de PCDDs/PCDFs y PCBs de la madre al hijo a través de la lactancia es cuantitativamente más importante que el transporte hacia el feto a través de la placenta. La excreción a través de la lactancia disminuye conforme aumenta el contenido en cloro de la molécula, siendo más pronunciado para los congéneres hepta- y



octacloro sustituidos. Como en los mamíferos, en las aves son el hígado y el tejido adiposo los sitios principales para el almacenaje y la acumulación de PCDDs/PCDFs y PCBs y el grado de deposición parece aumentar con el aumento del número de átomos de cloro, dando como resultado, una transferencia limitada de los congéneres más altamente tratados con cloro hacia los huevos (Van den Berg et al., 1994).

- *Metabolismo.* El metabolismo de PCDDs/PCDFs y PCBs es necesario para la eliminación urinaria y biliar, desempeñando así un papel importante en la regulación del índice de la excreción de éstos compuestos. En ratas, las reacciones metabólicas incluyen la oxidación, preferiblemente en las posiciones laterales y la decloración reductora así como la rotura de las uniones de oxígeno del difenil-eter. La oxidación de las dioxinas ocurre preferiblemente en las posiciones 2 y 3. En la metabolización de los PCDFs no hay rotura de las uniones de oxígeno. En los PCDFs 2,3,7,8 sustituidos, las posiciones 4 y 6 son más susceptibles al ataque metabólico que las 1 y 9. Consecuentemente, los PCDFs con cloros en las posiciones 4 y 6 son altamente persistentes en la biota. El metabolismo de PCDDs/PCDFs y DL-PCBs es un proceso de detoxificación, así la toxicidad es atribuible al compuesto padre sin cambios (Van den Berg et al., 1994).

- *Excreción.* La eliminación de los metabolitos polares de PCDDs/PCDFs y PCBs ocurre predominantemente por vía biliar y fecal, donde la excreción urinaria desempeña un papel muy minoritario. Sin embargo, se ha comprobado que esto no es así para todas las especies, ya que por ejemplo la eliminación urinaria desempeña un papel importante en el hámster. La semivida de PCDDs/PCDFs y PCBs en humanos es de alrededor de 6 meses, dependiendo del índice de cloración de la sustancia (Leung et al., 2006). La leche, debido a su composición grasa, (al igual que también los huevos en las aves) representa una vía muy eficaz de excreción en mamíferos (Brambilla et al., 2008). Al igual que en el resto de parámetros toxicocinéticos, el índice de cloración también influye en la excreción de PCDDs/PCDFs y PCBs, siendo esta menor cuanto mayor número de átomos de cloro tenga la sustancia.

#### ▪ **Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción mejor conocido y estudiado de las dioxinas y compuestos análogos es el que está mediado principalmente por su capacidad de unirse al receptor de aril hidrocarburos (*AhR*), del que son agonistas, induciendo la síntesis de proteínas.

El AhR es un factor de transcripción activado por unión de ligando que está implicado en la regulación de varios de genes, incluyendo muchos que codifican para enzimas que desempeñan un papel importante en el metabolismo de las sustancias tóxicas, así como en genes implicados en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Denison et al., 2003; Mandal, 2005). Parece ser que muchos de los efectos tóxicos atribuidos a 2,3,7,8-TCDD y análogos requieren la activación del AhR. La toxicidad de congéneres individuales se relaciona altamente con la afinidad con la que estos compuestos se unen al AhR, siendo más tóxicos los congéneres que se unen con mayor afinidad al AhR). Hay diferencias relacionadas con la especie afectada. Así por ejemplo las diferencias en la sensibilidad al 2,3,7,8-TCDD que se observan entre el ratón y la rata se pueden explicar parcialmente por diferencias en la afinidad de unión al ligando debido a variantes polimórficas del AhR, es decir, diferencias en la composición de aminoácidos del dominio de unión al ligando del AhR ( Karchner, Franks, Kennedy, & Hahn, 2006).

En ausencia de ligando, el AhR está como complejo soluble multiproteínico en el citoplasma celular. Cuando una dioxina o compuesto análogo atraviesa la membrana plasmática se une al AhR y el complejo ligando-AhR experimenta un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear. El complejo se trasloca entonces al núcleo de la célula y las chaperonas se disocian del complejo. El complejo AhR-ligando es capaz ahora de unir varias proteínas nucleares y formar heterodímeros que son capaces de unirse a determinadas regiones del ADN, conocidas como *elementos de respuesta a las dioxinas (DRE)*. La unión de los heterodímeros activados por ligando al DRE estimula la transcripción de una serie de genes. Entre los mejor conocidos están los que codifican para las enzimas de la subfamilia CYP1A1 del citocromo P450 (Abshagen et al., 1998; Denison et al., 2003). Se piensa, que la modulación continua e inadecuada de la expresión de estos genes es la responsable de una serie de cambios bioquímicos, celulares y de los tejidos que dan lugar a parte de los efectos tóxicos de estos compuestos (Mandal, 2005).

No obstante, a pesar de que este mecanismo explica algunos de los efectos atribuibles a la exposición a dioxinas, tanto los mecanismos de acción como los efectos tóxicos de la exposición a largo plazo a dosis bajas de estos compuestos son muy complejos y se encuadran en los fenómenos de *disrupción endocrina*, que ya discutimos en detalle en el apartado anterior.

## ▪ Toxicidad

Hay que destacar aquí, no obstante, que la toxicidad de los diferentes congéneres de PCDDs/PCDFs y PCBs difieren considerablemente entre sí. De los 210 posibles congéneres de PCDDs y PCDFs, sólo aquellos que tienen átomos de cloro en las posiciones 2-, 3-, 7- y 8- de los 2 anillos aromáticos son relevantes desde un punto de vista toxicológico. Son en total 17 congéneres que exhiben un perfil toxicológico similar, siendo el más tóxico de todos el que presenta átomos de cloro en las 4 posiciones: la 2,3,7,8 tetracloro-p-dibenzodioxina (2,3,7,8- TCDD). Por su parte, de los 209 congéneres posibles de PCBs, sólo 12 se considera que tienen efectos análogos a los del TCDD. Son los denominados DL-PCBs, que son los que presentan la capacidad de adoptar una conformación coplanar y tienen así la capacidad de unirse también al AhR (Safe, 2005). Si bien las PCDDs/PCDFs son considerablemente más tóxicas que los DL-PCBs, las cantidades de estos que se liberan al medioambiente son varias veces mayores y por lo tanto se encuentran habitualmente a concentraciones muy superiores en los alimentos que las PCDDs/PCDFs.

Se considera a las PCDDs/PCDFs y DL-PCBs entre las sustancias orgánicas más tóxicas que existen. Como veremos en el apartado 3, la exposición crónica a estas sustancias está relacionada con varios tipos de cáncer. Basándose tanto en estudios con animales como en evidencias epidemiológicas, la 2,3,7,8-TCDD ha sido catalogada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) dentro del grupo 1: “carcinógenos para el ser humano” (ref.). No obstante según la misma IARC, la 2,3,7,8-TCDD no es un carcinógeno directo, es decir no afecta directamente al material genético, y se considera que existe un nivel de exposición por debajo del cual el riesgo de que produzca cáncer es despreciable.

Cuando hablamos de exposición a PCDDs/PCDFs y DL-PCBs generalmente se trata de la exposición variable a mezclas complejas de varios congéneres individuales de PCDDs, PCDFs y PCBs. Con la finalidad de poder evaluar correctamente el riesgo de la exposición a estas sustancias, se desarrolló el concepto de *equivalencia de toxicidad (TEQ)* para describir la toxicidad acumulada de las mezclas complejas de estos compuestos (Ahlborg et al., 1992). El procedimiento consiste en la asignación a cada uno de los congéneres de PCDDs, PCDFs y DL- PCBs de un Factor de Equivalencia (TEF) con la toxicidad del 2,3,7,8-TCDD, que se toma como referencia (TEF = 1). El TEQ de una mezcla se calcula multiplicando las concentraciones de cada congénere individual por su TEF, para

obtener el TEQ de cada congénere y posteriormente sumando los TEQs individuales para obtener el TEQ total.

Mediante el Programa Internacional de Seguridad Química, la OMS ha establecido y reevaluado los TEFs para las dioxinas y compuestos análogos, a lo largo de los últimos 15 años, y ha decidido que los valores deben ser reevaluados periódicamente, a ser posible cada 5 años. Por este motivo los valores de TEF han ido cambiando desde su establecimiento en 1992 (M. Van den Berg et al., 2006). Para evitar confusiones se recomienda que se especifique como subíndice el año del valor de TEF que se ha usado.

#### **1.11.3.2. Contaminantes inorgánicos persistentes**

Los metales y metaloides son contaminantes ubicuos que han acompañado al hombre desde la más remota antigüedad. Así, los envenenamientos por arsénico, plomo y mercurio poseen un carácter legendario. La intoxicación crónica por plomo ocasionada por la presencia de este metal en las bebidas pudo ser causa del debilitamiento y caída del Imperio Romano. El uso del arsénico como veneno, tan socorrido en las novelas policíacas, encuentra su base real en numerosos incidentes históricos, como la preparación de cosméticos y pócimas por la célebre Toffana, envenenadora siciliana del siglo XVII. La exposición profesional al mercurio es la base de expresiones como temblar como un azogado (intoxicado por mercurio), en referencia a los efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central que experimentan las personas expuestas durante periodos prolongados a los vapores de este metal.

A diferencia de otros contaminantes ambientales, los metales son elementos químicos que el hombre no crea ni destruye. El papel que el hombre desempeña en la presencia ambiental de metales es, por una parte, introducir en el medio ambiente estos elementos como consecuencia de las distintas actividades humanas y, por otra, alterar la forma química o bioquímica en que se encuentran. Los metales están sujetos de forma natural a ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los compartimentos ambientales: suelos, aguas subterráneas y superficiales, aire y seres vivos. La intervención humana puede modificar considerablemente la concentración de metales en estos compartimentos y facilitar su distribución a partir de las reservas minerales en las que los metales se encuentran naturalmente confinados.

Desde el punto de vista toxicológico, los metales suelen presentar una acusada multiplicidad de efectos tóxicos. La especie química concreta del metal influye poderosamente en sus efectos tóxicos, así como en las variables toxicocinéticas de absorción, distribución y excreción. La trascendencia toxicológica de los metales es enorme, teniendo en cuenta su ubicuidad, la extensión de sus usos industriales y domésticos y su persistencia medioambiental, resultado directo de su condición de elementos químicos. Estas características son las que hacen que varios de ellos se consideren conjuntamente con los COPs cuando hablamos de *Contaminantes Tóxicos Persistentes*. Para diferenciarlos de aquellos, en esta Tesis Doctoral denominaremos **CIPs** a los *contaminantes persistentes de naturaleza inorgánica*.

#### 1.11.3.2.1. ARSÉNICO

- **Características y fuentes actuales de contaminación del As**

El omnipresente arsénico (As) es un no metal o metaloide del Grupo V de la tabla periódica aunque con frecuencia se conoce y se clasifica como un metal para muchos propósitos toxicológicos. Aparece en la naturaleza en forma trivalente y pentavalente formando parte de multitud de compuestos, entre los que podemos citar el trióxido de As y el arsenito sódico (formas de As trivalente) y el pentóxido de As y los arseniatos de plomo o calcio (As pentavalente). En el medio ambiente, el As existe generalmente como la forma *pentavalente* y puede **metilarse** por acción de las bacterias y otros seres vivos en sedimentos y aguas naturales.

Las fuentes de As que existen en el medio ambiente son tanto naturales (como las erupciones volcánicas) como antropogénicas. Entre estas últimas destaca el uso de compuestos de As como agentes conservantes de la madera y plaguicidas (herbicidas y fungicidas), la fundición de metales, la fabricación de aleaciones y semiconductores y la combustión del carbón y combustibles fósiles. Sus emisiones a la atmósfera consisten fundamentalmente en trióxido de As en forma de partículas, cuya deposición posterior depende de su tamaño y densidad. Puede introducirse en la atmósfera en forma volátil, como la *arsenamina* producida en los procesos de decapado ácido o de purificación de disoluciones por cementación con otros metales. El As trivalente, la arsenamina y sus derivados experimentan oxidación en el aire, de tal forma que el As en la atmósfera consiste en una mezcla de los estados de oxidación III y V (Khan, Owens, Bruce, & Naidu, 2009).

La exposición de la población general al As ocurre principalmente a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados, mientras que la exposición ocupacional se produce en trabajadores de las industrias de pintura, cerámicas, plaguicidas, preservantes de la madera principalmente (Ratnaike, 2003).

#### ▪ **Parámetros toxicocinéticos del As**

La movilidad y disponibilidad del As en el medio ambiente depende de su estado de oxidación y de las propiedades del medio en el que se encuentra. Las principales rutas de exposición al As son la ingestión de alimentos o agua de bebida, y la inhalación de partículas. En cuanto a la toxicocinética del As destacamos lo siguiente:

- *Absorción.* Hay muchos factores que influyen en la absorción de As. Entre esas variables se encuentran la forma en que se encuentra el metal, el tamaño de las partículas, la pureza, la solubilidad, las especies afectadas y la condición física de los animales expuestos. La susceptibilidad a As inorgánico varía entre las especies, siendo más alta en los seres humanos, seguidos por perros, ratas y ratones. El *As pentavalente orgánico* es mejor absorbido que el trivalente, especialmente a través del tracto gastrointestinal. Pequeñas cantidades de cualquiera de las formas pueden ser absorbidas a través de piel, aunque esta forma de exposición no es común. Sin embargo, la absorción está limitada por el tamaño de las partículas de As. Si el tamaño de partícula es demasiado grande no es absorbido. Por lo tanto, un compuesto de As más tóxico puede ver mermada su toxicidad si presenta tamaños de partícula muy grandes (Tseng, 2007).

- *Distribución.* Una vez que se absorbe el As, la distribución se realiza mediante la sangre a todos los órganos del cuerpo. El As se acumula en el hígado y lentamente se distribuye a otros tejidos. El bazo, riñones y pulmones son capaces de acumular grandes cantidades de As. Se ha demostrado que en el ser humano, el As es capaz de atravesar la barrera placentaria (Tseng, 2007).

- *Metabolismo.* La biotransformación del As es pobre. La biotransformación del As inorgánico implica la reducción de la forma pentavalente a la trivalente, seguida por la metilación de ambos estados de oxidación, obteniéndose como metabolitos ácidos *monometilarsénico* (MMA) y *dimetilarsénico* (DMA), que se excretan rápida y eficazmente. La *metilación* se produce por microorganismos en el suelo, y el As inorgánico también es metilado in vivo. El proceso in vivo puede ayudar en el proceso de desintoxicación. Los riñones pueden reducir una pequeña cantidad de As pentavalente al *trivalente más tóxico*. El

tiempo de vida media del As inorgánico en el cuerpo humano es de unas 10 horas. Sin embargo, la exposición continuada a As puede dar lugar a un desequilibrio entre absorción y excreción, con resultado final de acumulación de As en ciertos tejidos, como la piel y los tegumentos, donde tiende a concentrarse (Orloff, Mistry, & Metcalf, 2009; Tseng, 2007).

- *Excreción.* Los compuestos de As son excretados a través de muchos procesos. En la mayoría de las especies, entre 40% y el 70% de la cantidad absorbida de As pentavalente es excretada a través de la orina en un periodo de 48 horas. También puede ser excretado en cantidades mucho más pequeñas a través del sudor. Las formas trivalentes de As se excretan más lentamente y a través de la bilis. Una parte pequeña, pero muy relevante desde el punto de vista de la *biomonitorización* de la exposición crónica a As se excreta a través del pele y de las *uñas* (Orloff et al., 2009).

#### ▪ **Mecanismos de acción y toxicidad del As**

La intoxicación aguda por As produce náuseas, vómitos, diarrea, psicosis, neuropatía periférica, y erupción cutánea (Ratnaike, 2003). La exposición crónica a este metal resulta en la aparición de síntomas orgánicos y sistémicos, tales como hiperpigmentación y queratosis palmar, episodios recurrentes de diarrea, vómitos, arritmia, hipertensión y neuropatía periférica sensitiva (Ratnaike, 2003). Además, la exposición a As se asocia con la aparición de cáncer de piel, pulmones, riñones, hígado y vejiga (Bernstam & Nriagu, 2000). La IARC incluye este metal en el Grupo 1, es decir, entre las sustancias que son cancerígenos probados para el ser humano (Apostoli & Catalani, 2008). Por otra parte, resultados de estudios en animales demuestran que el arsénico produce toxicidad para el desarrollo, incluyendo malformaciones, muerte, y retraso del crecimiento. También se ha sugerido que las exposiciones ambientales arsénico son un riesgo muy importante para el feto en desarrollo (Golub, Macintosh, & Baumrind, 1998).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para comprender los mecanismos de acción responsables de los efectos de la exposición crónica del arsénico sobre la salud humana. Como ya hemos señalado, la especiación del As parece tener gran relevancia en muchos de los aspectos toxicológicos del este metal. Los resultados de muchos de estos estudios sugieren que gran parte de los efectos adversos del As se deben a la forma en que influye en el *sistema endocrino* (Watson & Yager, 2007). Es decir que, sorprendentemente, el As a dosis bajas, compatibles con las dosis a las que está expuesta la población general, es capaz de comportarse en el organismo bien como si fuera una hormona



o bien como un modulador de la acción de estas. Aunque ya discutimos el preocupante papel que juegan los CTPs como disruptores endocrinos, presentaremos aquí el estado actual del conocimiento que se tiene sobre los mecanismos que subyacen a los efectos adversos de bajas dosis de As sobre la salud humana.

El As a dosis similares al nivel de ingesta máxima tolerable por semana, fijado en 25  $\mu\text{g/kg/semana}$  (Nasreddine & Parent-Massin, 2002), ha demostrado tener efectos análogos a varias hormonas actuando en la modulación de transcripción nuclear de genes que son fisiológicamente regulados por ellas. Así, en un estudio llevado a cabo en células H4IIE de hepatoma de rata, la administración de una dosis no citotóxica (0.3-3.3 mM) de arsenito sódico produjo la inhibición de la actividad de transcripción nuclear del receptor de glucocorticoides (RG). Este trabajo demuestra que los mecanismos implicados no están mediados por la activación del RG, sino probablemente por la activación de algún receptor de membrana para estas hormonas, es decir por mecanismos no genómicos (Kaltreider, Davis, Lariviere, & Hamilton, 2001). En otro trabajo realizado en células EDR3, también de hepatoma de rata, se demostró que dosis menores de As (6-120 ppb) ejercen lo contrario, es decir efectos estimulantes sobre la activación de algunos genes dependientes del RG, como el gen de la tirosina aminotransferasa endógena (TAT) y otros genes que contienen elementos de respuesta al RG. Sin embargo concentraciones mayores (1-3 mM) tuvieron un claro efecto supresor de la actividad de estos genes en la misma línea celular. Es decir, que en un estrecho rango de concentraciones los efectos del As pasaron de ser claramente estimulatorios (4x) a producir una actividad supresora de la expresión génica. Una **respuesta bifásica** similar también se produce sobre otros receptores de hormonas esteroideas como el receptor de estrógenos (RE), el receptor de mineralcorticoides (RM), el receptor de andrógenos (RA) y el receptor de progesterona (RP) de células expuestas a formulaciones de As, y también sobre otros receptores como el receptor de retinoides (RAR) y por el receptor de hormona tiroidea (RT) (Davey, Bodwell, Gosse, & Hamilton, 2007; Davey et al., 2008). En todos estos casos también se observa una respuesta bifásica dependiente de la concentración, aparentemente mediada también por mecanismos no genómicos.

No obstante, no todos los efectos atribuibles al As son mediados por mecanismos no genómicos. Un buen número de estudios han demostrado que este metaloide produce claras alteraciones sobre el sistema reproductor masculino, disminuyendo el recuento espermático, la movilidad de los espermatozoides y en peso testicular en



experimentos realizados en ratas (Sarkar, Chaudhuri, Chattopadhyay, & Biswas, 2003), y que estos efectos parecen estar mediados por un mecanismo genómico clásico tras su unión con alta afinidad al RE, ya que el efecto pudo ser completamente bloqueado por la administración simultánea a los animales de un antiestrógeno (Jana, Jana, & Samanta, 2006). En este caso el arsenito sódico utilizado en estos experimentos se comportó de forma similar al 17- $\beta$  estradiol. Finalmente también ha podido demostrarse que la administración de As a hembras gestantes produce profundas modificaciones en la expresión génica en el hígado del feto, con la activación de numerosos genes regulados por los estrógenos, como resultado de complejas interacciones entre el metabolismo de los esteroides y las vías de señalización activadas por estrógenos (J. Liu et al., 2007). En un estudio reciente en mujeres embarazadas se utilizaron como metabolitos del ADN la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) oxidada y la N(7)-metilguanosina (N(7)-MeG) metilada como biomarcadores y comprobaron que existía diferencia estadísticamente significativa con correlación positiva entre los metabolitos del ADN oxidados y metilados y el descenso del test de Apgar al primer minuto de los RN cuyas madres tenían mayor concentración de As inorgánico y sus metabolitos en orina, concluyendo con que la exposición crónica al As puede estar asociada a un daño en el ADN tanto materno como fetal (Chou et al., 2014).

En cuanto a estudios sobre el As y los resultados en pacientes sometidas a FIV, no hemos encontrado ninguna publicación al respecto en las bases de datos consultadas.

- **Normativa legal sobre la presencia de As en alimentos**

La legislación de la UE ha establecido recientemente los límites máximos de residuos (LMRs) para el As en alimentos en el reglamento 1275/2013 de 6 de diciembre de 2013. El problema principal que lo ha impedido hasta la fecha, es que para el *arsénico inorgánico no existe aún una metodología normalizada, universalmente aceptada, de análisis y cuantificación.*

- **Niveles actuales de exposición alimentaria de los ciudadanos de la UE al As**

A diferencia de lo que veremos en otros elementos como el cadmio o el mercurio, el As inorgánico es más tóxico para el ser humano que las formas orgánicas. En cualquier caso, ambas formas, orgánica e inorgánica, están frecuentemente presentes como contaminantes en los alimentos que se consumen actualmente en la UE. En general se considera que los alimentos *procedentes del medio marino* son los que mayores

concentraciones de este elemento presentan. La concentración de As en los vegetales depende principalmente del contenido del elemento en el suelo, del nivel de contaminación del agua, de la polución del aire y de la cantidad de fertilizantes y otros fitoquímicos que se usen en su cultivo (Nasreddine & Parent-Massin, 2002).

Inicialmente, en el año 1969, la OMS estableció una ingesta máxima tolerable de 50  $\mu\text{g As/kg/día}$ , pero a la vista de los efectos adversos sobre la salud de dosis muy pequeñas de este elemento, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció provisionalmente un nuevo nivel de ingesta tolerable semanal, bajándolo hasta 15  $\mu\text{g/kg/semana}$  (OMS, 1989), pero limitándolo solo al As inorgánico, lo cual presenta un problema a la hora de establecer comparaciones, ya que la mayor parte de los estudios realizados determinan el As total, sin diferenciar si es de procedencia orgánica o inorgánica, así que en la mayoría de estudios comparativos se sigue utilizando del valor de 50  $\mu\text{g As/kg/día}$ .

La ingesta diaria de arsénico por los habitantes de la UE varía por países o regiones, al igual que ocurre en el caso de otros contaminantes, dependiendo principalmente de la dieta característica de dichos países/regiones. En el caso del As está directamente relacionado con el consumo de pescado y en general de productos procedentes del medio marino. Según el último estudio publicado (Nasreddine & Parent-Massin, 2002) la ingesta de As en la UE oscilaba entre los 38  $\mu\text{g/día}$  de los Países Bajos hasta los 286  $\mu\text{g/día}$  de España, que es el país de la UE que mayores niveles de exposición presenta. No obstante, estos consumos venían a representar sólo entre un 4-10% del valor de ingesta tolerable establecido por la OMS.

#### **1.11.3.2.2. CADMIO**

##### **▪ Características y fuentes actuales de contaminación del Cd**

El cadmio (*Cd*) es una impureza habitual en las menas de zinc, hasta el punto de que su propio nombre deriva del término latino para la calamina (carbonato de zinc). La calamina se utilizaba como materia prima para la obtención de óxido de zinc con usos farmacéuticos, y la presencia de Cd como impureza le impartía una coloración amarillenta. Fueron precisamente las investigaciones orientadas a descubrir la causa de esta coloración

indeseable las que condujeron a la identificación del Cd en 1817, en la Universidad de Gottingen.

El Cd puro es un metal suave y de color plata-blanco. Es un metal de transición divalente con propiedades químicas que son similares a las del zinc y se encuentra generalmente como un mineral en combinación con otros elementos para formar óxido de Cd, cloruro de Cd o sulfato de Cd (“Agency for Toxic Substances and Disease Registry”, [ATSDR], 2008).

Se utiliza en baterías, soldaduras, semiconductores, células solares, estabilizadores de plásticos y placas de hierro y acero. Todos los suelos y rocas contienen algo de Cd. Puede entrar en el entorno desde la fundición y refinado de zinc, combustión de carbón, desechos de minas, producción de hierro y acero y del uso de lodos de fosfato y aguas residuales como fertilizantes. También se utiliza el Cd en barras de control de los reactores nucleares. En todos sus compuestos el estado de oxidación del Cd es +2 (Jarup, Berglund, Elinder, Nordberg, & Vahter, 1998).

Las emisiones de Cd a la atmósfera a partir de procesos de combustión se producen habitualmente en forma de partículas de pequeño diámetro (partículas respirables) sujetas a transporte a larga distancia por acción del viento. Las emisiones desde fundiciones suelen estar formadas por partículas de mayor tamaño, más susceptibles de depositarse por gravedad a cortas distancias del punto de emisión.

La fuente de exposición ambiental más importante la constituye el *humo de tabaco* y el consumo de productos vegetales cultivados en terrenos contaminados por Cd y sus compuestos, especialmente en terrenos ácidos (Jarup et al., 1998).

La extracción, fundición, metalurgia y las industrias de galvanizado son las principales fuentes de exposición ocupacional a Cd, mientras que la exposición en la población general se produce por la ingestión de alimentos contaminados (carne, pescado, frutas) o por contacto con productos de consumo que contienen este metal (baterías de níquel/Cd, pigmentos, pinturas, productos de plástico, etc.).

#### ▪ **Parámetros toxicocinéticos**

Las vías principales de exposición a Cd medioambiental son la ingestión y la inhalación.

- *Absorción.* La absorción es más eficaz por vía inhalatoria y se ve favorecida por deficiencias dietéticas en calcio y hierro, así como por el consumo de dietas bajas en proteínas. En el ser humano y animales, la exposición al Cd es principalmente a través de la ingestión oral. En comparación con otros cationes divalentes como el zinc y el hierro, la absorción intestinal de Cd es relativamente baja, siendo aproximadamente del 1% al 5% en la mayoría de las especies, con hasta el 16% en el ganado, dependiendo de la dosis (Jarup et al., 1998). El consumo de dietas pobres en calcio estimula la absorción de este ión por síntesis de proteínas ligantes del calcio, lo que a su vez favorece la absorción de Cd.

- *Distribución.* Una vez alcanzado el torrente sanguíneo, el Cd se transporta ligado a proteínas plasmáticas de alto peso molecular, como la albúmina, así como a los hematíes. Parte del transporte de Cd en la sangre parece realizarse mediante formación de complejos con la metalotioneína, una proteína de bajo peso molecular que interviene en el transporte y detoxificación de metales mediante la formación de complejos estables entre los iones metálicos y los *grupos sulfhidrilo* de dicha proteína, compuesta en aproximadamente un 30% por el aminoácido cisteína. La metalotioneína se encuentra en la placenta, en la que ejerce un papel protector impidiendo el acceso de metales, como el Cd, a la sangre fetal. Se distribuye en todo el cuerpo con las mayores concentraciones en el hígado y los riñones, que representan aproximadamente la mitad del total del Cd en el cuerpo. En estos órganos se almacena en forma de complejo con *metalotioneína*. Los tejidos muscular y óseo no acumulan altas concentraciones de Cd. Las concentraciones de Cd en sangre son indicadores de exposición reciente mientras que Cd en orina es un mejor indicador de la carga corporal. El tiempo de vida media del Cd en el cuerpo humano es muy prolongado, pudiendo ser de aproximadamente 30 años.

- *Eliminación.* La excreción del Cd absorbido tiene lugar principalmente por la orina (0,09%) la mayor parte también en forma ligada con metalotioneína, y aproximadamente 0,007% en las heces a través de la bilis. A nivel renal se excretan complejos de Cd-proteínas pero son reabsorbidos desde el filtrado en los túbulos proximales. Como consecuencia, esta área de la corteza renal acumula Cd y es susceptible de sufrir daños y necrosis. Dependiendo de la especie, la vida media del Cd puede variar de meses a años, lo que da como resultado una bioacumulación del Cd a lo largo de la vida (Jarup et al., 1998).

## ▪ Mecanismos de acción y toxicidad del Cd

Los mecanismos de acción implicados en la toxicidad aguda del Cd son bien conocidos. Así se sabe que una vez dentro de la célula, el Cd libre se une a los grupos sulfhidrilo de proteínas, alterando el *ciclo redox* en las células, agotando el glutatión y provocando daños oxidativos intracelulares. Además, su similitud con otros cationes divalentes como el calcio hace que interfiera con su normal funcionamiento (Xiao, Liu, & Templeton, 2009). Los iones de Cd pueden desplazar zinc y otros metales divalentes desde sus sitios de enlace en *metalotioneínas*. Por ejemplo, en los testículos, el Cd puede interferir con zinc-proteínas, llevando a las células a la *apoptosis* y *necrosis*. En el hígado, resultados de toxicidad aguda de Cd resultan en apoptosis de hepatocitos generalizada, seguido por diversos grados de necrosis dependientes de la dosis (Klaassen, Liu, & Diwan, 2009).

El Cd se une fácilmente a las metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína, que se unen a metales. La unión a metalotioneínas no tiene un efecto importante en la captación de Cd, pero es, en parte, responsable de la retención del metal dentro de las células y su larga vida media. Debido a esta fuerte afinidad por las metalotioneínas la eliminación del Cd por bilis se ve limitada. Dentro de los hepatocitos, la metalotioneína se une al Cd disminuyendo su hepatotoxicidad, pero favoreciendo su acumulación. Experimentalmente, las ratas que tienen mayor inducción de metalotioneína en el hígado están protegidas de la hepatotoxicidad del Cd. Sin embargo, en los riñones el complejo Cd-metalotioneína es nefrotóxico y se ha teorizado que puede desempeñar un papel en la intoxicación crónica en los seres humanos (Klaassen et al., 2009).

Por otro lado, el Cd está clasificado como agente *cancerígeno* de grupo I por la IARC en 1993. Esta clasificación se basa fundamentalmente en la asociación entre exposición por inhalación a Cd y la aparición de cáncer de pulmón en estudios epidemiológicos realizados en trabajadores expuestos por vía inhalación en su centro de trabajo. También existen evidencias suficientes sobre los efectos cancerígenos del Cd inhalado en animales de laboratorio.

Nos interesa sobre todo destacar aquí que, al igual que el resto de los CIPs que estamos considerando en este apartado, el Cd tiene la capacidad de ejercer claros efectos sobre la *acción hormonal*, incluso a dosis muy bajas, compatibles con las dosis de exposición medioambiental a este metal (Iavicoli, Fontana, & Bergamaschi, 2009). Así, se ha demostrado que dosis pequeñas de Cd, incluso inferiores al nivel de ingesta máxima

tolerable por semana fijado para el Cd (7 µg/kg/semana) (Nasreddine & Parent-Massin, 2002) son capaces de afectar al patrón de secreción de hormonas como la *prolactina*, las gonadotropinas, la hormona adenocorticotropa (*ACTH*), la hormona de crecimiento (*GH*), la hormona tireoestimulante (*TSH*) o la *progesterona*, siendo estimulada su secreción a las dosis más bajas ensayadas e inhibida a las dosis más altas (Lafuente, Cano, & Esquifino, 2003). Estos efectos contradictorios dosis-dependientes han sido estudiados en profundidad en el caso de la *progesterona*. Parece que, en el caso de la progesterona, el Cd ejerce el efecto inhibitorio mediante una inhibición de la transcripción del receptor para lipoproteínas de baja densidad, lo que produciría una disminución en la biodisponibilidad de colesterol, sustrato necesario para la síntesis de la progesterona (Jolibois, Burow, et al., 1999; Jolibois, Shi, George, Henson, & Anderson, 1999). Como decimos, el efecto observado es dosis-dependiente y a las dosis más bajas se observa justo el efecto contrario, o sea, una estimulación de la síntesis hormonal.

Se ha demostrado que la exposición al Cd durante la gestación está fuertemente asociada con una reducción en el peso del neonato, así como con un incremento en la tasa de *abortos* espontáneos y de nacimientos pretérmino. Una posible explicación para este efecto parece estar en la influencia del Cd sobre la síntesis de determinadas hormonas como la gonadotropina coriónica humana (*hCG*) que, como sabemos, juega un papel fundamental en el mantenimiento y progresión de la gestación (Frery et al., 1993).

Otro efecto muy relevante del Cd es su *actividad estrogénica*, que ha podido ser demostrada tanto in vivo como in vitro. Usando la línea de tumor estable de mama MCF-7, una dosis de tan solo 1 µM Cd fue capaz de provocar un 58% de reducción de la transcripción génica mediada por el RE y de aumentar un 500% la expresión génica del RP (García-Morales et al., 1994). En experimentos in vivo también se comprobó el efecto estrogénico del Cd, tras la administración intraperitoneal del metal a ratas en las que se comprobó un aumento del peso del útero, desarrollo de las glándulas mamarias y la inducción de genes regulados por estrógenos en animales previamente ovariectomizados. Además es muy destacable el hecho de que la administración de Cd también tuvo un efecto transgeneracional en estos animales, ya que su descendencia tuvo una aparición precoz de la pubertad (M. D. Johnson et al., 2003). En otros estudios se demostró que el Cd también tiene efectos sobre el desarrollo fetal, en particular sobre las gónadas, produciendo una disminución del desarrollo de las mismas (Tam & Liu, 1985). Estos animales, una vez alcanzada la edad adulta, mostraron además una disminución evidente de los índices

reproductivos, ya que como se ha demostrado el Cd tiene también un efecto adverso sobre la integridad del acrosoma y, por tanto, sobre la viabilidad de los espermatozoides (Leoni et al., 2002).

- **Normativa legal sobre la presencia de Cd en alimentos**

Según dice textualmente el Reglamento (UE) 1275/2013 de la Comisión Europea por la que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios “El Cd puede acumularse en el cuerpo humano y provocar afecciones renales, alteraciones óseas y fallos del aparato reproductor. No puede descartarse que actúe como carcinógeno. El Comité Científico de Alimentación Humana (SCF) recomendó que se realizaran mayores esfuerzos para reducir la exposición al Cd en la dieta, puesto que los productos alimenticios son la principal fuente de ingesta humana de Cd. Por consiguiente, deben fijarse contenidos máximos lo más bajos que sea razonablemente posible”.

- **Niveles actuales de exposición alimentaria al Cd en la UE**

Se ha calculado que aproximadamente 1/3 de la ingesta de Cd se atribuye al consumo de alimentos de origen animal, mientras que los vegetales aportarían los 2/3 restantes (Nasreddine & Parent-Massin, 2002). En los diferentes estudios de dieta total realizados, los moluscos bivalvos, los riñones e hígado de los animales de abasto y las semillas oleaginosas, han sido identificados como los alimentos que mayores concentraciones de Cd presentan. Como dijimos anteriormente, la OMS ha fijado provisionalmente para este metal una ingesta máxima tolerable de 7 µg/kg a la semana (es decir 1 µg/kg/día). (WHO, 1993). Este valor de ingesta máxima toma en consideración el hecho de que los niños tienden a acumular Cd más rápido y en mayor proporción que los adultos, y basándose en un promedio de exposición de 50 años durante la vida (OMS, 1989). Los datos disponibles indican que la mayoría de los individuos presentan una ingesta de Cd inferior al valor tolerable de 7 µg/kg/semana.

El Grupo Científico sobre Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) fue consultado por la Comisión Europea para evaluar los riesgos para la salud humana relacionados con la presencia de Cd en los productos alimenticios. Para proporcionar una evaluación actualizada sobre la exposición al Cd a través de los productos alimenticios, se solicitaron alrededor de 140.000 datos que abarcan el período 2003 a 2007 sobre la presencia de Cd en los productos alimenticios a 20 Estados miembros de la UE (EFSA, 2009). Según este informe las mayores concentraciones de Cd fueron detectadas en



algas, pescados y mariscos, el chocolate, y alimentos para regímenes especiales. Para la mayoría de los alimentos sólo un pequeño porcentaje de las muestras analizadas (<5%) superó el LMR fijado en la UE.

Para evaluar la exposición dietética al Cd se utilizaron los datos del Registro Europeo de Consumo de Alimentos de la EFSA, y se usaron las encuestas nacionales de consumo de alimentos para estimar el patrón de consumo de determinados subgrupos poblacionales como los vegetarianos y los niños. Según los resultados de este estudio, los grupos de alimentos que contribuyen en mayor medida a la exposición dietética al Cd, sobre todo por el alto consumo de estos grupos alimentarios en la población europea, fueron los cereales y productos de cereales, las verduras, frutos secos y legumbres, las patatas y tubérculos y la carne y productos cárnicos.

La exposición media al Cd a través de la dieta en los países europeos se estimó en 2,3 µg/kg/semana (rango 1,9 a 3,0 µg/kg/semana) y los mayores niveles de exposición se estimaron en 3,0 µg/kg/semana (rango 2,5 a 3,9 µg/kg/semana). Debido a su elevado consumo de cereales, frutos secos, semillas oleaginosas y legumbres, los vegetarianos tienen una mayor exposición dietética al Cd, llegando a niveles de hasta 5,4 µg/kg/semana. Los consumidores habituales de moluscos bivalvos y setas silvestres podrían tener también niveles altos de exposición al Cd a través de la dieta, pudiendo alcanzar niveles de 4,6 y 4,3 µg/kg/semana, respectivamente. El tabaquismo puede contribuir a una exposición al Cd similar al de la dieta. También el polvo de la casa puede ser una fuente importante de exposición para los niños.

#### **1.11.3.2.3. MERCURIO**

##### **▪ Características y fuentes actuales de contaminación del Hg**

El mercurio (**Hg**) es un elemento natural que se encuentra en el medio ambiente. Existe en varias formas, la elemental, orgánica e inorgánica. Aproximadamente el 80% del Hg liberado al medio ambiente es Hg metálico y proviene de las actividades humanas, como la combustión de combustibles fósiles, minería, fundición e incineración de residuos sólidos. El Hg metálico puro a temperatura ambiente es una sustancia líquida blanca y brillante. Se solía utilizar en los termómetros (prohibido en la UE desde 2007),



barómetros, dispositivos de presión arterial, baterías, interruptores eléctricos, empastes dentales (amalgamas), etcétera. Forma sales cuando se combina con otros elementos, como el cloro, azufre y oxígeno (ATSDR, 1999).

Los usos del Hg han ido disminuyendo en las últimas décadas, siendo la preocupación por sus efectos tóxicos el impulso motor de modificaciones en procesos y materias primas tendentes a reducir su utilización; sin embargo, la actividad humana puede llevar a que los niveles de Hg en el suelo sean todavía unas 200.000 veces superiores a los niveles naturales.

La propiedad del Hg de amalgamar a otros metales, como el oro y la plata, y la facilidad de su separación posterior de la amalgama por calentamiento y volatilización del Hg son el fundamento de muchas aplicaciones históricas del Hg, como su empleo en la extracción de oro y plata, o en el dorado de objetos metálicos. Esta operación se llevaba a cabo recubriendo el objeto a dorar con amalgama de oro, tras lo cual se calentaba para evaporar el Hg, obteniéndose así una capa uniforme de oro sobre el objeto. De forma similar, los espejos se fabricaban mediante amalgama de plata. Tanto la industria extractiva, bien del propio Hg como del oro y la plata, como las distintas aplicaciones industriales de las amalgamas fueron causa de numerosos casos de enfermedades profesionales. El uso del Hg en la industria extractiva de los metales nobles sigue siendo en la actualidad una práctica habitual en países en vías de desarrollo (ATSDR, 1999).

Otra aplicación del Hg que ha experimentado un notable descenso en los últimos años es su uso como fungicida, en forma de compuestos *organomercuriales* (algunos ejemplos son el *metilmercurio* (**MeHg**), etilmercurio y fenilmercurio para el tratamiento de granos de cereal. Esta aplicación dio lugar a envenenamientos masivos en algunos países, como Iraq, en los que el grano tratado, inicialmente destinado a la siembra, se utilizó para obtener harina.

Otros usos del Hg son fines medicinales, por ejemplo, laxantes, antiparasitarios, antisépticos y desinfectantes (como la popular mercurina, hoy ya prohibida). En la actualidad, los usos más importantes del Hg se encuentran en la industria cloro-alcalina, con el uso del cátodo de Hg para el depósito electrolítico de sodio, la fabricación de pilas, lámparas fluorescentes y material para empastes dentales (ATSDR, 1999).

Las principales fuentes medioambientales de Hg elemental son los procesos naturales de volatilización del Hg a partir de depósitos minerales, volcanes y fumarolas o las fuentes termales. Entre las fuentes antropogénicas destaca la extracción y fusión de menas del propio Hg, pero también de otros metales, como el cobre, el oro, la plata, el plomo y el zinc, así como los procesos de combustión de combustibles fósiles. Los principales vertidos de Hg al medio acuático provienen de la industria metalúrgica y cloro-alcalina, así como de las aguas residuales domésticas (Clifton, 2007).

El vapor de Hg elemental constituye el 95% del Hg presente en la atmósfera. Puede ser transportado a gran distancia de su punto de introducción en el medio ambiente, lo que da lugar a ciclos globales de transporte. El resto del Hg atmosférico se encuentra asociado a la materia particulada. Mientras que el Hg vapor puede desplazarse a grandes distancias, con un tiempo de vida media en la atmósfera en el rango de 6 días a 2 años, el Hg en materia particulada se elimina más rápidamente por deposición húmeda o seca, en un tiempo que depende fundamentalmente del tamaño de partícula. Una vez depositado en el suelo, el comportamiento del Hg depende, como en el resto de los metales, de su estado de oxidación y del compuesto químico del que forme parte. El Hg elemental y los compuestos organomercuriales volátiles, como el dimetilmercurio, pueden vaporizarse de nuevo y pasar a la atmósfera. En el medio ambiente diversas formas de Hg son intercambiables entre sí por la acción de bacterias, hongos y mamíferos. Por ejemplo, el Hg inorgánico puede ser metilado a **MeHg** y a su vez, el MeHg puede cambiar al Hg inorgánico o elemental. Los animales situados en la parte superior de la cadena alimentaria tienden a *bioacumular* Hg y MeHg, tanto en forma inorgánica como, especialmente, en forma orgánica como derivados del metil y fenilmercurio. Esta tendencia se ha constatado en numerosas *especies acuáticas*, tanto de agua dulce como marina (Tchounwou, Ayensu, Ninashvili, & Sutton, 2003).

La población general está expuesta al Hg principalmente a través de la ingestión de alimentos contaminados, en particular al pescado en donde el Hg se acumula en forma de MeHg, la carne, los cereales, y también otros alimentos como los vegetales o los productos lácteos (Bhan & Sarkar, 2005). La exposición al Hg también se produce en la población general a través de las amalgamas dentales por la liberación del metal durante la masticación (Gochfeld, 2003).

### ▪ **Parámetros toxicocinéticos del Hg**

- **Absorción:** El Hg metálico o elemental es el más que se absorbe (80%) desde los pulmones, mientras se absorbe muy poco desde el tracto gastrointestinal (< 0.5%). Sin embargo, el Hg orgánico (por ejemplo, el MeHg) se absorbe fácilmente desde el tracto gastrointestinal (95%) (Holmes, James, & Levy, 2009).

- **Distribución:** Una vez que el Hg entra en la circulación se distribuye rápidamente a otros tejidos, principalmente a los riñones, donde se acumula. El Hg metálico puede permanecer en el cuerpo durante semanas y meses. Debido a su alta lipofiliidad, el Hg metálico puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) y la placentaria. En los tejidos, el Hg elemental se oxida rápidamente a Hg divalente, forma en la que atraviesa con más dificultad las membranas celulares, en particular las citadas barreras hematoencefálica y placentaria. Sin embargo, el Hg elemental puede permanecer en la sangre durante unos minutos en el estado de oxidación cero, tiempo suficiente para permitirle la entrada en el sistema nervioso. Las formas orgánicas de Hg, sin embargo, atraviesan las barreras con mucha facilidad. En general el Hg se acumula en hígado, riñón, cerebro y ganglios linfáticos, lo que indica que el sistema linfático puede desempeñar un papel importante en el transporte de Hg a los órganos diana (Holmes et al., 2009).

- **Metabolismo:** Todas las formas de Hg presentan una metabolización similar en el ser humano y en los animales. El Hg se metaboliza a través del ciclo de oxidación-reducción que se lleva a cabo en la microflora intestinal. Las formas orgánicas de Hg sufren desmetilación en los tejidos. Las tasas de eliminación de MeHg parecen variar con la especie, dosis, sexo y raza. La vida media en sangre es variable, dependiendo de la forma química, pero puede situarse en un promedio de alrededor de 50 días (Holmes et al., 2009).

- **Excreción:** La mayor parte del Hg metálico absorbido se excreta en la orina y las heces. Cantidades relativamente altas pasan también a la leche. El Hg orgánico se defeca en forma de Hg inorgánico en las heces durante un período de varios meses (Holmes et al., 2009).

### ▪ **Mecanismos de acción y toxicidad del Hg**

El Hg se considera muy tóxico para el ser humano y los animales pero, como hemos dicho, los efectos tóxicos dependen de la formulación química, de la cantidad y duración de la exposición y de la ruta de la exposición. En términos generales se considera

que el Hg orgánico es más tóxico y produce mayor número de intoxicaciones que el inorgánico. La inhalación de concentraciones elevadas de Hg elemental puede provocar bronquitis corrosiva y neumonitis aguda, que puede causar la muerte. Las dianas de la toxicidad aguda incluyen los sistemas nervioso, inmunológico y los riñones y, dependiendo de la ruta de exposición, el tubo digestivo, los pulmones y para las formas inorgánicas, la piel. La exposición crónica a dosis relativamente altas (ocupacional), tiene sin embargo sus efectos tóxicos fundamentales en el sistema nervioso central. Los síntomas de la intoxicación crónica por Hg incluyen temblores, hipertrofia de la tiroides, taquicardia, gingivitis, cambios en la personalidad, eretismo, pérdida de memoria, depresión severa, delirios y alucinaciones. Los tres rasgos característicos de la intoxicación por Hg, usados históricamente para reconocer los casos de enfermedad profesional en la industria, son la excitabilidad, los temblores y la gingivitis. También se han descrito casos de afección renal causados por la exposición crónica al Hg elemental, cuyos síntomas incluyen la proteinuria y enzimuria, efectos reversibles que desaparecen cuando la persona afectada deja de estar expuesta a los vapores de Hg (Bhan & Sarkar, 2005).

Los efectos teratogénicos del MeHg son devastadores: la exposición uterina del feto provoca la alteración de las pautas normales de migración de las neuronas, causando la disrupción de la arquitectura del cerebro. Se ha propuesto un mecanismo de toxicidad basado en los efectos adversos del MeHg sobre la formación de los *microtúbulos* de las neuronas, lo que repercute en la estructura celular, la alteración de la comunicación intercelular del cerebro en desarrollo y la migración de las neuronas (Tchounwou et al., 2003).

El mecanismo de acción que subyace a los efectos tóxicos del Hg orgánico e inorgánico es similar. La toxicidad de las diferentes formas de Hg está relacionada, en parte, con su acumulación en tejidos delicados. Se cree que el principal mecanismo de acción en las intoxicaciones, tanto agudas como crónicas, tiene que ver con la alta afinidad de unión del Hg catiónico divalente a los *grupos sulfhidrilo (SH)* de las proteínas, que daría como resultado la inactivación de diferentes enzimas, proteínas estructurales, proteínas de transporte y alteración de la permeabilidad de las membranas celulares. Otros mecanismos involucrados en la toxicidad del Hg son: ***aumento del estrés oxidativo***, peroxidación lipídica, disfunción mitocondrial, depleción del glutatión, aumento de la permeabilidad de la BHE, interrupción de la formación de microtúbulos, síntesis de proteínas, replicación de

ADN, actividad de la ADN polimerasa, homeostasis del calcio, transmisión sináptica y respuesta inmune (Tchounwou et al., 2003).

Por lo que respecta a su comportamiento como agente cancerígeno, los compuestos de MeHg se encuentran clasificados en el grupo 2B, posiblemente cancerígenos para el hombre, por la IARC (1993), mientras que el Hg elemental y los compuestos de Hg inorgánico están clasificados en el grupo 3, es decir, no son clasificables en cuanto a su actividad cancerígena, siendo inadecuada la evidencia disponible tanto en lo referente a personas como a animales de ensayo.

Hay que destacar, no obstante, que aparte de los conocidos efectos clínicos de la exposición aguda o crónica al Hg, cada vez es mayor el cuerpo de evidencias que enfatizan la importancia de los efectos subclínicos de la exposición a dosis ambientales de Hg, vehiculados por los alimentos (principalmente el pescado, los cereales o la carne, pero también los productos lácteos y los vegetales) y el agua (Iavicoli et al., 2009).

Así, al igual que el As y el Cd, también el Hg parece tener cierta influencia sobre los niveles fisiológicos de las **hormonas reproductivas**. La administración a animales de experimentación de MeHg en la dieta en dosis inferiores al valor provisional de ingesta máxima tolerable semanal (5 µg/kg/semana) (Nasreddine & Parent-Massin, 2002) fueron suficientes para disminuir los niveles plasmáticos de 17-β estradiol (Drevnick & Sandheinrich, 2003) y efectos similares se han observado para la testosterona y la corticosterona. Experimentos realizados con el mismo rango de dosis bajas fueron capaces de interferir con el proceso reproductivo: en machos se observó alteración de la espermatogénesis, dando como resultado una reducción en la motilidad y en el recuento espermático (Chowdhury, Vachhrajani, & Chatterjee, 1985), y en hembras **abortos**, malformaciones congénitas, **infertilidad** e *inhibición de la ovulación* (Schuurs, 1999).

En estudios poblacionales en humanos las evidencias son más limitadas, pero también existen bastantes estudios que indican que la exposición crónica a dosis dietéticas de Hg tiene influencia sobre el sistema endocrino, habiéndose demostrado correlación positiva entre los niveles de **Hg en pelo** y los niveles de estrona y estradiol, tanto en hombres como en mujeres (Agusa et al., 2007); correlación positiva con los niveles de hormonas tiroideas (Ellingsen et al., 2000); y también con las concentraciones de TSH (Abdelouahab et al., 2008).

- **Normativa legal sobre la presencia de Hg en alimentos**

Al igual que el caso del Cd, los niveles de Hg que pueden estar presentes en los alimentos que se comercializan en la UE también están regulados por el Reglamento (UE) 1275/2013 de la Comisión Europea por la que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, ya que como dice textualmente “El metilmercurio puede provocar alteraciones del desarrollo normal del cerebro de los lactantes y, a niveles más elevados, puede causar modificaciones neurológicas en los adultos. El mercurio contamina principalmente el pescado y los productos de la pesca. Los contenidos deberán ser lo más bajos que sea razonablemente posible, teniendo en cuenta que, por razones fisiológicas, determinadas especies concentran el mercurio en sus tejidos con más facilidad que otras”.

- **Niveles actuales de exposición alimentaria de los ciudadanos de la UE al Hg**

Ambas formas del Hg, inorgánico y orgánico, aparecen frecuentemente en los alimentos. El nivel de Hg encontrado en los distintos productos alimenticios es muy variable y refleja los niveles de contaminación del medioambiente local donde son producidos. Los vegetales absorben solo cantidades limitadas, muy pequeñas, de Hg a través de sus raíces, incluso aunque sean cultivadas en suelos altamente contaminados. La mayor parte del Hg en los vegetales resulta por tanto de la deposición del Hg atmosférico en forma de aerosoles sobre la superficie de las hojas (Miller et al., 2005). Los niveles de Hg que se encuentran en los productos alimenticios de origen animal oscilan habitualmente entre 0.001 a 0.03 mg/kg. Las vísceras de los animales, principalmente el hígado y riñones, el *pescado* y *el marisco* tienden a concentrar el Hg medioambiental. Los *organismos marinos* son particularmente preocupantes ya que tienen la capacidad de biotransformar el Hg inorgánico a formas orgánicas conteniendo este metal, principalmente *MeHg*, lo cual lo convierte en mucho más biodisponible. Hay determinadas especies, como el *atún* y otros peces depredadores, que llegan a acumular concentraciones muy altas de mercurio. En general se tiende a considerar que el consumo de pescado, en particular grandes especies de peces depredadores, es la principal fuente de exposición humana al Hg.

El JECFA ha establecido provisionalmente un nivel de ingesta tolerable de 1.6 µg MeHg/kg/semana para la población general (equivalente a 0.22 µg MeHg/kg/día) pero hace énfasis en que las mujeres gestantes o en periodo de lactancia son especialmente

vulnerables a los efectos adversos del Hg por lo que recomienda que este valor de ingesta semanal baje a la mitad en este grupo de riesgo (WHO, 1989).

Los resultados de los diferentes estudios llevados a cabo en países de la UE demuestran que los niveles de ingesta de Hg a través de la dieta en la UE permanecen relativamente bajos (Nasreddine & Parent-Massin, 2002), con unos niveles que oscilan entre los 0.7 µg/kg/semana que se consumen en Holanda y los 13.5 µg/kg/semana de Bélgica, que siendo el país con mayores niveles de consumo de la UE, representa solamente un 42% del nivel de ingesta tolerable.

#### **1.11.3.2.4. PLOMO**

##### **▪ Características y fuentes actuales de contaminación de Pb**

El plomo (**Pb**) es un metal pesado de color blanco azulado grisáceo que fue probablemente el primer elemento tóxico reconocido por el hombre y que aún hoy tiene gran relevancia. El símbolo químico de plomo, Pb, viene de la palabra latina plumbum, que significa plata líquida. La principal fuente de Pb es el mineral llamado galena, que contiene sulfuro de Pb. El uso principal de Pb es hoy en día en baterías de Pb, pero históricamente ha tenido amplio uso en pinturas y como un aditivo de la gasolina aunque estos últimos usos han sido retirados. Aún hoy existen importantes usos del Pb con soldaduras de Pb, electrónica, vidrio que contienen Pb, perdigones y munición de armas de fuego. Entre todos los metales, el envenenamiento por Pb se encuentra con mayor frecuencia en ciertas especies de animales y plantea un grave problema para la salud de los ecosistemas, sobre todo de las aves acuáticas.

El uso histórico de Pb en la gasolina, pintura, materiales de construcción y muchos otros productos se ha traducido en que el Pb sea uno de los contaminantes ambientales más importantes en el mundo. Las principales fuentes de exposición profesional al Pb son las operaciones de extracción, fusión y refinamiento del metal, así como la inhalación de los humos desprendidos durante la soldadura o recubrimiento de metales por pulverización de Pb fundido. Las principales fuentes de contaminación ambiental por Pb son la fundición y la minería, las refinerías, la eliminación de basuras y las industrias de reciclaje de Pb (OMS, 1995). En los países donde la gasolina con Pb está aún en uso, el tráfico de



vehículos de motor constituye la principal fuente de contaminación atmosférica por emisiones de Pb (OMS, 1995).

La población general está expuesta al Pb a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados y la inhalación de aire con partículas de Pb (OMS, 1995) ya que en la atmósfera el Pb forma parte de la materia particulada, normalmente en forma de óxidos o carbonatos, que en función del tamaño y densidad de partícula se depositan por gravedad en poco tiempo o, en el caso de las partículas más finas, pueden permanecer en suspensión y ser transportadas por el viento a distancias considerables de su punto de emisión. Una vez depositado en el suelo, el Pb queda en su mayor parte retenido en la capa superficial (2-5 cm de profundidad), especialmente en suelos con un contenido en materia orgánica superior al 5% y un pH mayor que 5. El Pb no se lixivia fácilmente hacia las capas profundas del subsuelo y hacia el agua subterránea excepto en medios muy ácidos.

La biodisponibilidad del Pb para las plantas se ve dificultada por la adsorción de este metal en la matriz del suelo, pero aumenta a medida que disminuye el pH y el contenido en materia orgánica del suelo. Tanto las plantas como los animales pueden bioconcentrar el Pb, aunque no se ha observado su biomagnificación en la cadena trófica.

#### ▪ **Parámetros toxicocinéticos del Pb**

- *Absorción.* La principal vía de entrada de Pb en el cuerpo es el tracto digestivo. La absorción depende de la forma química de Pb y el estado fisiológico del animal. Los compuestos orgánicos de Pb son generalmente mejor absorbidos que las sales inorgánicas o el Pb elemental. La absorción dérmica de los compuestos orgánicos de Pb es buena, pero las formas inorgánicas no se absorben por esta vía. La absorción inhalatoria del metal depende en primer lugar del tamaño de partícula, ya que sólo aquellas con diámetro inferior a 0,05  $\mu\text{m}$  permanecen en los alvéolos, mientras que las de tamaño superior pasan fácilmente al tracto respiratorio por aclaramiento mucociliar. Sin embargo, las partículas con Pb de diámetro suficientemente pequeño permanecen en los alvéolos y la absorción del Pb que contienen es eficaz y completa. La tasa de absorción del Pb por ingestión es del 5-15% en adultos. Los niños absorben más eficientemente que los adultos el Pb ingerido en la dieta. La absorción del Pb contenido en el agua de bebida es más alta que la del Pb presente en alimento. La absorción de Pb desde el tracto alimentario generalmente está influenciada por factores dietéticos y por el tamaño de las partículas. Las dietas pobres en grasa y minerales pueden incrementar la absorción de Pb 7-20 veces (O'Flaherty, 1998).



- *Distribución.* El Pb se transporta mayoritariamente unido a la membrana de los eritrocitos (60-90%, dependiendo de la especie) y la mayor parte del resto de Pb se conduce unido a proteínas como la hemoglobina y sólo una proporción muy pequeña viaja libre en el suero. Desde la sangre, el Pb se distribuye muy desigualmente entre los distintos tejidos. La máxima concentración se alcanza en los *huesos*, que actúan como lugares de almacenamiento de este elemento. El tiempo de vida media del Pb en los huesos es muy elevado, superior a 20 años. Este depósito puede movilizarse durante la lactancia, embarazo o la acción de agentes quelantes. De lo contrario, el Pb tiene una tasa de eliminación del hueso muy lenta. La retención y movilización de Pb en los huesos se produce por el mismo mecanismo que regula el calcio. El Pb depositado en los huesos se intercambia fácilmente con la sangre, por lo que el depósito de Pb en los huesos constituye en todo momento una posible fuente de Pb para todo el organismo. Aunque el Pb se encuentra en todos los tejidos, los órganos en los que aparece en mayor medida, por detrás de los huesos, son el hígado, los riñones y el sistema nervioso central. El Pb cruza la barrera placentaria y se puede detectar en cantidades significativas en sangre de feto y órganos. Entre los órganos del feto, se encuentran las mayores concentraciones en la sangre y en el hígado y también se excreta en la leche (O'Flaherty, 1998).

- *Eliminación.* El Pb es normalmente muy lentamente excretado a través de la bilis y una pequeña proporción en la orina. También aparece en el sudor y, como hemos dicho, en la leche materna. La terapia de quelación aumenta en gran medida la excreción urinaria de Pb (O'Flaherty, 1998).

#### ▪ **Mecanismos de acción y toxicidad del Pb**

El Pb interfiere con varios procesos bioquímicos en el cuerpo mediante el establecimiento de enlaces con los *grupos sulfhidrilo* de las proteínas (y con otros grupos funcionales nucleófilos). Esto produce la inhibición de varias enzimas y cambios en el metabolismo de calcio y vitamina D. El Pb también contribuye al *estrés oxidativo* en el organismo (Ahamed & Siddiqui, 2007). Es bien conocido el papel inhibidor del Pb sobre la síntesis de hemoglobina, al interferir en varios pasos enzimáticos en síntesis del grupo hemo. Esta inhibición contribuye de forma decisiva a la *anemia* que se observa en la intoxicación crónica por Pb. Una mayor fragilidad de los glóbulos rojos, por inestabilidad de la membrana plasmática de los eritrocitos, también contribuye a la anemia (Palis, 2008).

Diversos estudios experimentales sugieren que el Pb es *neurotóxico*, alterando significativamente ciertas funciones y estructuras cerebrales. Dosis altas de exposición a Pb (es decir, niveles de sangre por encima de 4  $\mu$ M) producen alteración de la BHE. Además de un efecto tóxico directo a las células del endotelio, el Pb puede alterar indirectamente la microvascularización por dañar los astrocitos que proporcionan las señales para el mantenimiento de la integridad de la BHE y necrosis en neuronas con citoplasma rugosos, núcleos picnóticos y aumento del espacio perineuronal. Como consecuencia, moléculas como la albúmina que normalmente son excluidas de los territorios nerviosos centrales, entran libremente al cerebro de animales inmaduros expuestos a estas concentraciones de Pb. A la entrada de proteínas le sigue la de iones y agua, produciéndose en consecuencia, *edema cerebral*. La presión intracraneal aumenta a medida que el edema se acumula. Cuando la presión intracraneal se aproxima a la presión sistémica, la perfusión cerebral disminuye y se produce la isquemia cerebral (Marchetti, 2003).

Pero muchos de los efectos neurotóxicos del Pb se han relacionado también con la capacidad del Pb para imitar o en algunos casos inhibir la acción de calcio como regulador del funcionamiento celular. A nivel neuronal, la exposición al Pb altera la liberación de neurotransmisores como la dopamina, la acetilcolina o el GABA (Silbergeld, Miller, Kennedy, & Eng, 1979).

Como consecuencia de estos mecanismos de acción la exposición al Pb produce una amplia gama de efectos adversos sobre la salud humana, tales como anemia, trastornos psicológicos, neuropatía periférica, nefropatía y cólicos abdominales (OMS, 1995). Niveles sanguíneos de Pb de 5 a 10 mg/dL se asocian con trastornos neuroconductuales y una reducción significativa en la capacidad cognitiva en niños debido a los niveles de deterioro de la atención, concentración y memoria (Tellez-Rojo et al., 2006).

Además de los efectos mencionados hay que destacar que también se han descrito efectos sobre el *sistema reproductor femenino* (alteraciones en el embarazo y la fertilidad) y el *masculino* (alteraciones morfológicas de los espermatozoides y el recuento de esperma) relacionados con la exposición a dosis ambientales de Pb, vehiculadas por los alimentos y el agua (Iavicoli et al., 2009), es decir, fenómenos perfectamente encuadrables en el concepto de ***disrupción endocrina*** que ya discutimos extensamente en el punto 1.11.2. de esta Introducción de Tesis Doctoral. Baste decir aquí que dosis muy pequeñas de exposición al Pb se han relacionado con alteraciones en la afinidad del RE y del receptor para la LH por sus ligandos naturales (Wiebe & Barr, 1988; Wiebe, Barr, & Buckingham,

1988); interferencias a múltiples niveles en el eje hipotálamo-hipofisis-gónadas (Srivastava et al., 2004); reducción en los niveles séricos de IGF-1, LH, testosterona, estradiol y StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda) (Srivastava et al., 2004); modificación de la edad de inicio de la pubertad (Dearth et al., 2004) y, por último, cambios morfológicos y funcionales de los espermatozoides (Kasperczyk et al., 2008).

#### ▪ **Normativa legal sobre la presencia de Pb en alimentos**

Al igual que el caso del resto de elementos inorgánicos considerados en esta Tesis Doctoral, los niveles de Pb que pueden estar presentes en los alimentos que se comercializan en la UE también están regulados por el Reglamento (UE) 1275/2013 de la Comisión Europea por la que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios), ya que como dice textualmente “La absorción de Pb puede constituir un grave riesgo para la salud pública. El Pb puede provocar un retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños y causar hipertensión y enfermedades cardiovasculares en los adultos. En los últimos diez años, los contenidos de Pb de los productos alimenticios se redujeron sensiblemente porque aumentó la sensibilización ante el problema sanitario que puede representar el Pb, por los esfuerzos realizados para reducir la emisión de Pb en su origen y por los progresos en la garantía de calidad de los análisis químicos. En su dictamen de 19 de junio de 1992, el SCF establecía que el contenido medio de Pb en los productos alimenticios no parece ser causa de alarma pero que debe proseguirse la acción a largo plazo con el objetivo de continuar reduciendo los contenidos medios de Pb en los productos alimenticios. Por consiguiente, los contenidos máximos deben ser lo más bajos posible.”. El Reglamento establece los niveles máximos de Pb que pueden estar presentes en los alimentos que se comercializan en la UE.

#### ▪ **Niveles actuales de exposición alimentaria de los ciudadanos de la UE al Pb**

Las concentraciones de Pb en los diferentes productos alimenticios varían mucho dependiendo de la región geográfica. Como hemos visto el Pb en los alimentos aparece como consecuencia principalmente de la deposición atmosférica sobre los vegetales y de la adherencia a los mismos de partículas de Pb a partir de suelos enriquecidos en este metal.

Se estima que aproximadamente la mitad de la exposición de los seres humanos al Pb proviene de los alimentos, y aproximadamente la mitad de esta cantidad está originada en la contaminación de los vegetales. Los análisis realizados en alimentos

demuestran que el contenido de Pb en alimentos de origen vegetal es bastante superior al encontrado en los de origen animal. En las regiones en las que siguen utilizándose tuberías de Pb, se encuentran concentraciones elevadas de este metal en el agua potable, lo cual aumenta significativamente la ingesta a través de las bebidas y de los alimentos cocinados con agua o al vapor.

El valor máximo de ingesta semanal de Pb ha sido fijado provisionalmente en 25  $\mu\text{g/kg/semana}$  (equivalentes a 3.6  $\mu\text{g/kg/día}$ ) por el JEFCA en el año 1993 (OMS, 1993).

La ingesta diaria de Pb por los habitantes de la UE varía por países o regiones, al igual que ocurre en el caso de otros contaminantes, dependiendo principalmente de la dieta característica de dichos países/regiones, encontrándose desde niveles muy bajos como los 16  $\mu\text{g/día}$  de España, que suponen tan solo el 7% de la ingesta máxima recomendada, hasta los 280  $\mu\text{g/kg/día}$  del estudio de Italia, que en este caso supone que se sobrepasa el nivel de ingesta diaria máxima recomendado (Nasreddine & Parent-Massin, 2002). Además de Italia, Bélgica y Grecia parecen ser los países que mayores niveles de ingesta de Pb presentan entre los estudios realizados en países de la UE.

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) elaboró un informe en abril de 2010 sobre la presencia de niveles de Pb en los alimentos comercializados en la UE y estimación actualizada de los niveles de ingesta por países, de forma similar a como ha hecho con otros contaminantes como el Cd, el Hg o las dioxinas.

#### **1.11.4. Estudios de los contaminantes ambientales sobre la fertilidad**

Existen abundantes estudios sobre contaminantes ambientales relacionados con la salud reproductiva y la fertilidad (Foster, Neal, Han, & Dominguez, 2008; McDiarmid, Gardiner, & Jack, 2008; Wigle et al., 2008). Como expusimos en otro apartado, existe una gran variedad de contaminantes ambientales como el metil-mercurio, el plomo, los pesticidas, los humos de soldar, los disolventes orgánicos, las radiaciones ionizantes y las colas y barnices que han mostrado en distintos estudios tener un efecto negativo sobre la fertilidad y el desarrollo fetal (Ford, MacCormac, & Hiller, 1994; Foster et al., 2008; Homan, Davies, & Norman, 2007; McDiarmid et al., 2008). Sin embargo, hay pocos estudios focalizados sobre los efectos de los contaminantes ambientales en la población estéril. Mencionamos algunos ejemplos como un estudio de cohortes realizado en

Holanda sobre 726 parejas que iban a ser sometidas a una FIV, donde se mostró una disminución de la tasa de implantación en mujeres cuyas parejas tenían una elevada exposición laboral a disolventes orgánicos (Tielemans et al., 2000). En el Reino Unido, un estudio multicéntrico caso-control de 2118 parejas estériles con exposición laboral a tóxicos atendidas en 14 clínicas de fertilidad mostró que los varones con exposición moderada y alta al glicol éter poseían un recuento disminuido de espermatozoides (OR 1,46, 95% CI= 0.93-2.28 y OR 2.25, 95% CI = 1.08-4.69 en los grupos de moderada y alta exposición respectivamente, una vez ajustados los potenciales factores de confusión) (Cherry et al., 2008). También existe evidencia que sugiere que la oligoastenoteratozoospermia (OAT) observada en pacientes atendidos en clínicas de fertilidad españolas podría estar relacionada con la exposición a tóxicos laborales (Mendiola et al., 2008). Sin embargo, la utilidad de estos estudios es restringida debido a que el tamaño muestral suele ser pequeño y a que el diseño suele realizarse con diversas limitaciones. De todos modos, considerando la evidencia disponible, se recomienda que las parejas que estén planeando un embarazo reduzcan al máximo posible la exposición a tóxicos potenciales tanto domésticos como laborales (Homan et al., 2007; McDiarmid et al., 2008; Mendola, Messer, & Rappazzo, 2008).

#### **1.11.5. Estilos de vida y su influencia sobre los tratamientos de reproducción asistida**

##### **1.11.5.1. ESTRÉS**

La incidencia de la esterilidad ha aumentado de forma significativa en los últimos años, entre otras causas por el nuevo rol que desempeña la mujer en la sociedad actual. El retraso en la decisión de concebir es un claro condicionante de la fertilidad, al disminuir con el paso del tiempo la reserva folicular y la fecundabilidad. Por ello, cada vez más mujeres deben ser sometidas a tratamientos de reproducción asistida. Cuando las mujeres estériles deciden consultar su problema, frecuentemente presentan *estrés* y *ansiedad* provocados por la frustración que supone la pérdida de la fertilidad, las molestias del proceso diagnóstico y la incertidumbre por el resultado terapéutico. Estrés que se suma al generado por su situación laboral y profesional, que a su vez contribuye a provocar infertilidad. La relación adversa entre el estrés y el pronóstico reproductivo ha sido descrita

en múltiples publicaciones, sin embargo no hay muchos trabajos epidemiológicos que estudien el efecto del estrés sobre la fecundidad. Es importante saber si el efecto del estrés puede actuar de forma nociva sobre la fecundidad en parejas a priori sanas.

Un estudio sobre los niveles de estrés medidos basalmente y hasta la consecución del embarazo o al menos durante 6 ciclos de seguimiento, realizado a través de cuestionarios psicométricos en 430 parejas que estaban planeando una gestación, encontró que la probabilidad de concepción era menor en los ciclos con mayor nivel de estrés, 12,8% frente a 16,5% (Hjollund et al., 2000). Cuando una mujer estéril consulta su problema sufre una experiencia estresante por la incertidumbre sobre el proceso diagnóstico, el miedo a experiencias dolorosas y el temor al fracaso de las técnicas de reproducción asistida. Su pronóstico, además de estar influido por factores biomédicos bien conocidos como la edad, la causa de la esterilidad, el índice de masa corporal, los antecedentes reproductivos previos, etc., lo estará también por las consecuencias de esa experiencia estresante, acompañada de sentimientos de ira, frustración, envidia, culpa, etc. y que puede provocar alteraciones psicológicas como *ansiedad* y *depresión*. Además, algunos trabajos destacan la alta prevalencia de alteraciones psiquiátricas previas entre las pacientes estériles que pueden desequilibrarse durante el tratamiento de la esterilidad. Por ello es importante que durante el tratamiento de la esterilidad el ginecólogo esté atento a estos desarreglos y ante la menor sospecha consulte con el psicólogo o el psiquiatra.

Es escasa la bibliografía que estudia exclusivamente el papel de las alteraciones emocionales durante el tratamiento mediante inseminación artificial, ya que la mayoría de los estudios se centran en la fecundación in vitro. A pesar de ello, parece que a menor escala también la inseminación artificial provoca alteraciones emocionales. Es numerosa la bibliografía que describe peores resultados terapéuticos de la FIV en las pacientes con mayores niveles de estrés. Sin embargo, la situación emocional de la mujer puede estar condicionada por el resultado del tratamiento reproductivo. Otro estudio prospectivo holandés no encuentra diferencias en los niveles basales de estrés de las pacientes estériles frente a otras de un grupo control, pero cuando el resultado de la fecundación in vitro es fallido, las mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida presentan una elevación de las alteraciones emocionales negativas, que sin embargo se corrige cuando se consigue la gestación (Verhaak et al., 2005). Es necesario resaltar la gran heterogeneidad de los estudios publicados en la forma de medir el estrés. Algunos lo hacen valorando los efectos directos por los cambios en las hormonas del estrés y otros por medios

indirectos mediante test psicométricos. Varios autores describen unos bajos niveles de correlación entre los cuestionarios psicológicos para la valoración del estrés y los indicadores hormonales del mismo, lo que podría explicar las diferencias encontradas en la bibliografía.

#### ▪ **Mecanismo de acción del estrés**

El mecanismo mediante el cual el estrés puede alterar el resultado de la fecundación in vitro es desconocido. Se postulan varias alternativas: alteración de la respuesta ovárica a la estimulación, disminución de la calidad ovocitaria provocada por los cambios en el ambiente folicular inducidos por las hormonas del estrés y la alteración de la implantación embrionaria. La implantación embrionaria es el acontecimiento fundamental de la FIV. Diversos estudios apoyan el importante papel que desempeña el sistema inmunitario en este acontecimiento, señalando a las *células T* y las *NK* como protagonistas en el éxito o fracaso de la implantación. Ya hemos visto cómo el estrés produce alteraciones inmunitarias mediante el estímulo de las células sanguíneas, provocando un desequilibrio de respuestas celulares (Th1 frente a Th2) y una inducción de apoptosis en los linfocitos T y NK (Arck, 2004). Varios trabajos demuestran que los cambios en las poblaciones linfocitarias achacados al estrés se correlacionan con peores tasas de implantación en los ciclos de fecundación in vitro. Además de la influencia negativa que puede producir el estrés sobre la fertilidad y las técnicas de reproducción asistida, es importante resaltar que las parejas tanto en Europa como en Estados Unidos señalan al estrés psicológico como el factor determinante a la hora de tomar la decisión de abandonar las TRA sin completar los ciclos de tratamiento previstos. Todo lo anterior nos debe hacer recapacitar sobre la necesidad de apoyo afectivo y psicológico a las pacientes estériles en tratamiento con TRA, tanto para mejorar los resultados como para evitar que los abandonen.

#### **1.11.5.2. ÍNDICE DE MASA CORPORAL**

La obesidad es una patología cuya incidencia ha aumentado en las últimas décadas sobre todo en países desarrollados. De hecho, en la década pasada, España ocupó el tercer lugar en obesidad infantil. El incremento de la ingesta calórica y la disminución de la actividad física es el factor más importante para su desarrollo, aunque en los últimos años se ha demostrado un factor hereditario. Así, una madre obesa predispone a sus siguientes generaciones a múltiples patologías entre ellas la propia obesidad. Se ha descrito que el



porcentaje de parejas infértiles en el mundo occidental fluctúa entre el 10 y el 20%, pero este porcentaje es mayor entre las pacientes obesas. Actualmente se considera sobrepeso un índice de masa corporal (IMC)  $>25 \text{ Kg/m}^2$  y obesidad un IMC  $> 30 \text{ Kg/m}^2$  (tipo 1 entre 30 y 35, tipo 2 entre 35 y 40 y tipo 3 u obesidad mórbida por encima de 40). Que la obesidad interfiere en la capacidad reproductiva, tanto la natural como la dependiente de técnicas de reproducción asistida, es un hecho contrastado por múltiples estudios, especialmente si la obesidad es central.

#### ▪ Mecanismo de acción del IMC

El efecto deletéreo sobre la fertilidad se puede deber a alteraciones sobre el ciclo natural (amenorrea u oligomenorrea) mediado por el sistema Kiss/peptinas/leptinas/GnRH (Quennell et al., 2009) o a una influencia negativa sobre el desarrollo folicular, el ovocito, el embrión o el endometrio en mujeres eumenorreicas. Este deterioro de la capacidad reproductiva ya se puede observar en pacientes con sobrepeso que aún no llegan a ser catalogadas de obesidad según su índice de masa corporal (IMC). La manera que la obesidad afecta a la reproducción parece ser un desajuste hormonal que se caracteriza por el aumento de la producción de insulina y andrógenos asociado a un cuadro en el que la ovulación se encuentra comprometida. Este cuadro clínico se ve potenciado cuando la obesidad es extrema, es de tipo central o está asociada a otra alteración como es el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). El endometrio, lugar donde se asienta el huevo, también podría verse afectado según los últimos estudios (Becker, Passos, & Moulin, 2015)

Un estudio prospectivo de cohortes que incluyó a 2.793 mujeres normoovuladoras subfértiles que llevaban más de un año intentando la gestación, en las que se había descartado anovulación, obstrucción tubárica bilateral o factor masculino severo en la pareja, concluyó en que la obesidad es un importante factor de riesgo de infertilidad, ya que por cada unidad de IMC por encima de 29 kilogramos/ $\text{m}^2$  se reduce un 5% la probabilidad de conseguir la gestación durante el primer año de búsqueda, una reducción que es comparable a la del incremento de un año en la edad de la mujer. Este estudio presenta algunas limitaciones, como que no se tuvo en cuenta ni el IMC del varón ni la frecuencia de relaciones sexuales. (2008 van der Steeg et al.)

En 2012 se publicó una revisión de 14 artículos que estudiaron la relación de la obesidad con la fertilidad natural y tras técnicas o tratamientos de reproducción asistida (TRA), valorando además si la obesidad se relaciona con un aumento de las complicaciones.



Observando una ligera disminución en el porcentaje de nacidos vivos en mujeres obesa y con sobre peso (OR del 90%), con respecto a mujeres sin sobrepeso. No encuentran diferencias significativas en cuanto a la incidencia de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) al comparar mujeres con sobrepeso con mujeres de peso normal, tampoco constan diferencias en cuanto a tasas de embarazo múltiples, ectópicos, hemorragia, infecciones y tromboembolismos (Koning et al., 2012).

En el documento publicado por la European Society of Human Reproduction and Embriology Task Force on Ethics and Law en 2010, se expone que en mujeres con sobrepeso y obesidad existe una reducción del 30% en las tasas de éxito con TRA, además de un incremento del 30% en tasas de aborto (Ethics et al., 2010). Estos datos se justifican por el efecto deletéreo de la obesidad tanto en la función ovárica como en la endometrial, del mismo modo que se muestra en algunos estudios que aprovecha la ovodonación como modelo de investigación.

Todo esto hace que las obesas sean mujeres más proclives a ser sometidas a tratamientos de reproducción asistida (TRA) y aunque los avances en el campo de la reproducción han logrado incrementar las tasas de embarazos en estas pacientes, estas siguen estando por debajo de aquellas sin sobrepeso ( $IMC < 25$ ). Cabe mencionar que estos pobres resultados de las TRA se acompañan por un mayor uso de medicación, periodos de estimulación más prolongados y mayores tasas de cancelación, encareciendo aún más el tratamiento.

La obesidad durante el embarazo supone un mayor riesgo de preeclampsia, diabetes gestacional, macrosomía y finalización en cesárea, entre otras complicaciones. Estos riesgos aumentan proporcionalmente con el grado de obesidad. Además, la obesidad se asocia con mayor número de anomalías congénitas (defectos del tubo neural, anomalías cardíacas) y predispone al futuro del niño a un mayor riesgo de síndrome metabólico y otras enfermedades del adulto. Aun así, ninguna guía clínica establece cuál sería el umbral por encima del cual estaría contraindicado un embarazo. El protocolo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) de 2011 sobre obesidad y embarazo recomienda evitar la gestación en estos casos de obesidad mórbida. La guía de Reproducción Humana Asistida del Servicio Andaluz de Salud (SAS) establece como límites para acceso a las TRA un IMC entre 18 y 32.

En cuanto a la disminución de la fertilidad natural en mujeres con anorexia nerviosa o con importante pérdida de peso no se da el mismo consenso en la literatura. Tanto

la obesidad como el bajo peso se han asociado a un incremento del riesgo de aborto, tanto tras embarazos espontáneo como tras fecundación invitó/inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV/ICSI), y tanto con transferencia de embriones en fresco como con congelados (Veleva et al., 2008).

Como conclusión basada en la evidencia, desde el punto de vista de la salud reproductiva, se considera ideal un IMC entre 20 y 25 kg/m<sup>2</sup>. Las desviaciones, tanto superiores como inferiores, se relacionan con una disminución de la fertilidad, ya sea natural como tras tratamientos de reproducción.

### **1.11.5.3. DIETA Y ACTIVIDAD FÍSICA**

Aunque la actividad física se ha mostrado eficaz en la reducción del riesgo de múltiples enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, la depresión y algunos cánceres, su relación con la fertilidad es menos clara. Algunos estudios en atletas femeninas han encontrado alteraciones en el ciclo menstrual, incluyendo un aumento del número de días de ciclo menstrual, de la fase folicular, una disminución de la fase lútea, oligomenorrea y amenorrea. En general se postula que el efecto de la actividad física sobre la fertilidad puede ser positivo hasta un cierto umbral y ser deletéreo por encima de ese nivel.

Los estudios epidemiológicos que relacionan la actividad física vigorosa (en frecuencia de intensidad) con la fertilidad no han sido concluyentes, apuntando algunos a una reducción y otros a un incremento del riesgo de infertilidad. En un estudio realizado sobre 2.232 mujeres que se iban a someter a una FIV (Morris et al. en 2006), se observó que en mujeres que realizaban ejercicio físico durante más de 4 horas semanales existía una reducción del 40% en la tasa de recién nacidos vivos, el triple de riesgo de cancelación del ciclo de FIV y el doble de riesgo de fallo de implantación y de aborto, comparado con mujeres que no realizaban la actividad física. En otro estudio danés, bien diseñado, prospectivo de cohortes, se observó cómo la actividad física vigorosa (atletismo, ciclismo, aeróbic, natación, gimnasia), producía una reducción significativa de la fertilidad, sin embargo, esto sólo se constató en mujeres con un IMC < 25 kg/m<sup>2</sup>, ya que en mujeres con sobrepeso y obesas se comprobó que existía un ligero efecto positivo de todos los niveles de ejercicio (Wise et al., 2012). Basándose en estos datos, los autores recomiendan a las mujeres con un IMC < de 25 kg/m<sup>2</sup> que están intentando concebir que limiten el ejercicio

físico vigoroso a menos de cinco horas por semana o lo cambien por un ejercicio físico más moderado.

La relación entre dieta y fertilidad tampoco ha sido bien definida, excepto en las situaciones extremas. Todos los datos en humanos proceden de estudios observacionales. Un extenso estudio prospectivo de cohortes (Chavarro et al. en 2007) sobre más de 18.000 mujeres premenopáusicas sin historia de infertilidad que estaban intentando una gestación señala los siguientes hábitos dietéticos como beneficiosos para una adecuada fertilidad (dieta de la fertilidad): mayor cantidad de ácido grasos monoinsaturados que trans, mayor porcentaje de proteínas de origen vegetal que animal y baja ingesta de hidratos de carbono con alto índice glucídico y grasas, así como la toma de hierro y suplementos vitamínicos. Sugieren que la dieta anterior es favorable a la homeostasis de la glucosa y a la sensibilidad de la insulina, factores que desempeñan un papel importante en la función ovulatoria (Chavarro, Rich-Edwards, Rosner, & Willett, 2007). Otros pequeños estudios observacionales han apoyado el efecto beneficioso de la dieta mediterránea en la concepción natural o con TRA. Estas dietas no tienen ningún perjuicio asociado, pero en la actualidad no disponemos de evidencia suficiente para recomendar cambios dietéticos con la finalidad de mejorar la fertilidad.

La *enfermedad celiaca* no tratada o no diagnosticada, tanto en hombres como en mujeres, puede causar subfertilidad, que se resuelve adoptando una dieta libre de gluten.

#### **1.11.5.4. HÁBITO TABÁQUICO**

El consumo de tabaco tanto en mujeres como en hombres se asocia, en general, a una disminución de la fertilidad natural (tasa de fecundidad) que es dosis-dependiente. En una revisión sistemática de la literatura, incluido un metaanálisis, se observó que el consumo de cigarrillos podría llegar a explicar hasta un 13% de las causas de esterilidad femenina, lo que es atribuible a que varias sustancias que contiene el tabaco podrían producir un efecto tóxico sobre el desarrollo folicular, la actividad aromatasa de las células de la granulosa o provocar un cambio mutagénico en los gametos. Esto llevaría a una aceleración de la depleción folicular, una reducción de la tasa de fecundidad, un aumento de abortos y una precipitación de la edad de la menopausia (Augood, Duckitt, & Templeton, 1998).

A pesar de la heterogeneidad de muchos estudios, existe un metaanálisis que proporciona pruebas concluyentes sobre el significativo efecto negativo del consumo de cigarrillos en los resultados clínicos de los TRA. Debería éste ser el modelo que presentar a las pacientes infértiles que continúan fumando durante el tratamiento, con el fin de animarlas a optimizar las tasas de éxito. Los autores concluyen que el hábito tabáquico durante los TRA se asocia a niveles inferiores de estradiol plasmático, menor número de ovocitos recuperados y tasas más bajas de fecundación y de implantación, así como a tasas inferiores de gestación y de recién nacido en casa (Waylen, Metwally, Jones, Wilkinson, & Ledger, 2009). Otros estudios no encuentran diferencias significativas, aunque sí subrayan que para obtener las mismas tasas de embarazo, las fumadoras requieren dosis más altas de gonadotropinas (Farhi & Orvieto, 2009).

▪ **Mecanismo de acción del tabaco en la salud reproductiva de la mujer.**

Los cigarrillos contienen más de 4.000 compuestos, entre los que destacan la nicotina, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), el cadmio, etc. con diversos efectos sobre la esfera reproductiva de la mujer. Éstos compuestos tóxicos del tabaco actúan en cada etapa de la función reproductiva: la *foliculogénesis*, la *esteroidogénesis*, el *transporte embrionario*, la *receptividad endometrial*, la *angiogénesis endometrial*, el *flujo de sangre en los vasos uterinos* y el *miometrio*. El efecto del tabaco, como ya se ha expuesto, es dosis-dependiente y está influenciado por la presencia de otras sustancias tóxicas y el estatus hormonal de la mujer. La sensibilidad individual, la dosis, el tiempo y el tipo de exposición, también juegan un papel en el impacto del tabaco en la reproducción humana. Son necesarios más estudios para comprender mejor el efecto deletéreo que producen los compuestos del tabaco en el sistema reproductivo y poder profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en toxicología reproductiva.

○ Foliculogénesis

El hecho de fumar cigarrillos se asocia con el riesgo de una anterior aparición de la menopausia, adelantándose ésta hasta 2 años. La reserva ovárica parece ser menor en las fumadoras, así, en estas mujeres se ha demostrado un mayor nivel de FSH basal (Cooper et al., 1995). En otro estudio evaluaron la hormona anti-mülleriana (AMH) en pacientes con FSH comparable y los niveles de estradiol (E2) en día 3º del ciclo y encontraron que la AMH fue significativamente menor en las fumadoras (3,06 vs 3,81 ng/mL) (Freour et al., 2008). Estudios experimentales confirman el efecto nocivo del humo

de los cigarrillos, así, en un modelo de ratón expuesto a benzopireno se observó una disminución del peso ovárico (Mattison, Singh, Takizawa, & Thomford, 1989). Cuando diferentes tipos de modelos animales fueron expuestos a metabolitos del humo del cigarrillo, tales como Cd, nicotina o benzopireno, independientemente de la vía de administración (intraperitoneal, oral o intraovárica), la pérdida de folículos fue reportada en todas las etapas de la foliculogénesis (Mattison et al., 1989). Los folículos primordiales parecen ser especialmente sensibles al humo del cigarrillo (Tuttle, Stampfli, & Foster, 2009). Además, el crecimiento folicular también se demostró que quedaba inhibido al comprobarse que se desarrollaban folículos de menor tamaño tras la administración nicotina (Bordel, Laschke, Menger, & Vollmar, 2006) o tras la exposición al benzopireno (Neal, Zhu, Holloway, & Foster, 2007). El crecimiento folicular en un cultivo de folículos aislados de ovario de rata en quedó disminuido en un 35% cuando se expuso a 1.5 ng/mL de benzopireno, una concentración equivalente a niveles encontrados en el líquido folicular de mujeres que fumaron un promedio de 15 cigarrillos/día (Neal et al., 2007). El deterioro del crecimiento folicular podría explicarse por alteraciones morfológicas del complejo cumulus-ovocito (COC). Cuando en cultivos de COC porcino fueron expuestos a compuestos del humo del cigarrillo, como cotinina, nicotina, anabasina y Cd, se encontraron un efecto inhibitorio sobre la expansión del cumulus con matriz extracelular anormal (Vrsanska, Nagyova, Mlynarcikova, Fickova, & Kolena, 2003). Por otro lado, la síntesis de ácido hialurónico quedó disminuida en presencia de Cd y nicotina. Otros estudios demostraron un efecto negativo dosis-dependiente de la nicotina en la expansión COC bovina, así como una disminución en la formación del espacio perivitelino, sugiriendo que componentes del humo inducían un deterioro en el proceso mucificación. Se estudiaron los efectos de metabolitos del humo en cultivos de células de la granulosa humanas, encontrando que a altas dosis de Cd o dosis bajas con tiempos de exposición más largos, las células de la granulosa se empezaron a separar, se observaron anomalías nucleares y retracción de las extensiones celulares (Paksy et al., 1997). Adicionalmente, altas dosis de Cd produjeron necrosis en las células de la granulosa (Leoni et al., 2002). Se investigó el efecto del tabaquismo sobre la maduración de ovocitos en pacientes de FIV en función de la edad, hallando que en menores de 35 años existía una correlación positiva entre el número de cigarrillos fumados y la cotinina folicular (Zenzes, Reed, & Casper, 1997). Sorprendentemente, una correlación positiva también se observó entre el nivel de cotinina folicular y la tasa de maduración de ovocitos. En cambio, en un modelo de rana expuesto a Cd, se observó una acumulación de este metal en los ovarios, así como un retraso en el desarrollo y maduración ovocitaria.

(Lienesch, Dumont, & Bantle, 2000). Diferentes resultados en cuanto a la maduración de ovocitos en estos dos estudios podrían explicarse por diferencias en los tóxicos estudiados y los modelos utilizados. En un modelo de ratón expuesto a la nicotina, se estudiaron la tasa de anomalías cromosómicas en los ovocitos de metafase II, encontrándose que en los ratones no expuestos, las tasas de separación prematura de cromátidas y anafase precoz eran respectivamente 4.6 y 0.3%, mientras que en el grupo expuesto a altos niveles de nicotina las tasas fueron respectivamente de 9.2 y 5.4% (Mailhes, Young, Caldito, & London, 2000). Tasas más elevadas de anomalías morfológicas del ovocito y aneuploidías se observaron después de la exposición a la nicotina, lo cual sugiere efectos deletéreos de los metabolitos del humo a nivel del COC y la maduración nuclear.

Se ha hallado la presencia de múltiples metabolitos del humo del tabaco en tejido ovárico. Así, la nicotina y la cotinina fueron encontradas en líquido folicular, detectando niveles de cotinina de 710.4, 76,3 y 4,2 ng/mL, respectivamente, en fumadoras activas, pasivas y no fumadoras, con una correlación positiva entre los niveles de cotinina folicular y la tasa de consumo de cigarrillo (Zenzes, Reed, Wang, & Klein, 1996). La cotinina también fue detectada en el núcleo y el citoplasma de las células de la granulosa (Zenzes, Puy, & Bielecki, 1997). El benzopireno también fue identificado en las células de la granulosa (Zenzes, Puy, & Bielecki, 1998). En otro estudio se investigaron las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) a nivel folicular en los pacientes de FIV y se encontró que niveles de benzopireno se correlacionaron positivamente con el consumo femenino de cigarrillos (detectándose niveles de benzopireno de 1.32, 0.05 y 0.03 ng/mL., respectivamente, en fumadoras activas, pasivas y no fumadoras) (Neal, Zhu, & Foster, 2008). Esto puede sugerir que el líquido folicular, que contiene el folículo en crecimiento, actuaría como *sumidero de sustancias tóxicas*, como por ejemplo el benzopireno. Así, establecieron que una concentración de benzopireno de 1.5 ng/mL. en líquido folicular se correspondía con un consumo de 15 cigarrillos/día. El Cd también fue detectado en el tejido ovárico humano y el fluido folicular de mujeres sometidas a FIV, con niveles más altos en las fumadoras que en las no fumadoras (Zenzes, Krishnan, Krishnan, Zhang, & Casper, 1995). Todos estos estudios nos permiten concluir con que el líquido folicular y las células ováricas pueden retener compuestos tóxicos y, por tanto, crear un ambiente tóxico para el crecimiento del folículo y la maduración de los ovocitos, en diferentes grados, dependiendo del número de cigarrillos fumados por día.

De este modo, se han descrito algunos mecanismos implicados en el deterioro de la foliculogénesis como son, el **estrés oxidativo** anormal, el aumento de la apoptosis celular, la comunicación anómala intercelular a nivel del ovocito y la granulosa y el deterioro de la función nuclear del ovocito.

Se ha llegado a medir la actividad oxidativa folicular en las fumadoras mediante productos de peroxidación de lípidos, siendo ésta de 0.49, 0.50 y 1,07 mmol/mL y la capacidad antioxidante total que fue de 440.0, 385.4 y 362.3 mmol/mL, respectivamente, en las no fumadoras, fumadoras pasivas y activas, además, se observó que existía una correlación positiva entre la tasa de peroxidación lipídica y el nivel de exposición de la paciente al humo del cigarrillo (Paszkowski, Clarke, & Hornstein, 2002). Los efectos del humo del cigarrillo sobre el estrés oxidativo son bien conocidos, actuando sobre la apoptosis celular y la aneuploidía (van der Vaart, Postma, Timens, & ten Hacken, 2004). El Cd mostró ser un agente implicado en el aumento del estrés oxidativo ovárico. A nivel experimental, se evaluaron los efectos del Cd y el Pb sobre el estrés oxidativo en ovario de ratón utilizando células de la granulosa expuestas *in vitro* a estos metales y células de la granulosa aisladas de ratones expuestos durante períodos de 15 días, donde los resultados fueron un aumento de la peroxidación lipídica de las células de la granulosa, una reducción de la concentración de glutatión, una mayor actividad catalasa y una actividad disminuida de la superóxido dismutasa (Nampoothiri, Agarwal, & Gupta, 2007).

El consumo de tabaco ha sido asociado con la atresia folicular, la cual implica mecanismos complejos que conducen a la muerte celular programada (*apoptosis*). Existe una mayor expresión y síntesis de Bax, una molécula pro-apoptótica, que fue observada en ovarios de ratón después de la exposición al benzopireno (Matikainen et al., 2001). La acción del benzopireno está mediada por el receptor de hidrocarburo de arilo (*AhR*), un receptor citoplásmico identificado en células de la granulosa e implicado en el crecimiento del folículo (Bussmann & Baranao, 2006), lo cual sugiere que Bax y *AhR* estarían implicados en la fisiopatología de la apoptosis de las células de la granulosa. En un estudio de marcadores de apoptosis en ovarios de ratones expuestos al humo del tabaco se encontraron niveles más bajos de una proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Tuttle et al., 2009). En otro estudio en el que se utilizó tejido ovárico humano trasplantado por vía subcutánea a ratones expuestos a PAH, observaron una “up-regulation” de *harakiri* (proteína que interacciona con Bcl-2 involucrada en las vías fisiopatológicas de la muerte celular) en la granulosa y en células del estroma (Jurisicova et al., 2007).



Otras investigaciones en las células de la granulosa demostraron que tras ser expuestas al Cd se caracterizaban por una retracción citoplasmática y menos uniones intercelulares (Paksy et al., 1997). También se observó in vitro que el benzopireno inhibía la formación de gap junctions, siendo éstas indispensables para la comunicación intercelular ovocito-células de la granulosa (Sharovskaya, Kobliakova, Solomatina, & Kobliakov, 2006). En las células de Sertoli y de la granulosa expuestas al Cd se observaron bajos niveles de conexina 43 (molécula estructural de las gap junctions) (Fiorini et al., 2004; Gershon et al., 2008). Además, componentes del humo del tabaco se han asociado a daño en el ADN, así, utilizando el ensayo COMETA, se estudiaron las consecuencias nucleares en células de la granulosa de las pacientes de FIV y se observaron mayores tasas de roturas de filamentos de ADN en fumadoras (Sinko, Morocz, Zadori, Kokavszky, & Rasko, 2005).

El consumo de cigarrillos se asoció con un mayor riesgo de aneuploidía de los ovocitos (Zenzes, Wang, & Casper, 1995). En modelos de ratón expuestos a la nicotina se observaron mayores tasas de anomalías cromosómicas y disyunción prematura de cromátides hermanas durante la meiosis (Mailhes et al., 2000). En células germinales de rata expuestas a dosis altas de benzopireno, se observó una inhibición y bloqueo de la meiosis (Georgellis, Toppari, Veromaa, Rydstrom, & Parvinen, 1990), lo que implica que componentes de humo pueden inducir alteraciones del huso meiótico. En este sentido, con ovocitos bovinos expuestos a la nicotina, se observó un índice creciente dosis dependiente de aneuploidía durante la meiosis con husos irregulares, malformados y multipolares, alineación cromosómica anormal y microfilamentos desordenados. Con estos hallazgos, se sugirió que los filamentos de actina podían ser el blanco de la nicotina, dando como resultado microfilamentos desorganizados y segregación cromosómica anormal. También se estudiaron los efectos de la nicotina en husos meióticos de ovocitos bovinos en las diferentes etapas de la meiosis y se encontraron que los husos de la segunda meiosis eran mucho más sensibles a la nicotina. Todos estos mecanismos podrían además explicar la maduración nuclear anormal de los ovocitos tras la exposición al humo del tabaco (Liu et al., 2007; Liu et al., 2008).

En conclusión, el humo del cigarrillo se asocia con el deterioro de la foliculogénesis. Los ovarios retienen compuestos de humo, resultando un ambiente tóxico en el interior del folículo, induciendo un aumento del estrés oxidativo, una anormal comunicación intercelular, un deterioro de la meiosis y una activación de vías



fisiopatológicas de la muerte celular. Las consecuencias son pérdida de folículos, crecimiento anormal de los mismos y deterioro de la morfología y la maduración ovocitaria.

○ Esteroidogénesis

Entre los componentes del humo del cigarrillo, algunos se muestran como auténticos disruptores endocrinos (Mlynarcikova, Kolena, Fickova, & Scsukova, 2005). Las fumadoras presentan un perfil endocrino alterado, caracterizado por mayores niveles de testosterona (Barbieri et al., 2005), alto nivel de FSH y menor nivel de E2 durante la estimulación ovárica en ciclos de FIV (Van Voorhis et al., 1996). Varios autores han observado que los compuestos humo del tabaco alteran la esteroidogénesis llevando a una disminución en síntesis de estradiol y a un déficit en la síntesis de progesterona (Gocze, Szabo, & Freeman, 1999; Sanders, Cuneo, & Turzillo, 2002; Vidal, VandeVoort, Marcus, Lazarewicz, & Conley, 2006). El análisis de determinados componentes del líquido folicular en fumadoras tratadas con FIV reveló una reducción en la concentración estrogénica con una mayor relación andrógeno/estrógenos, indicativa de un ambiente folicular androgénico (Van Voorhis et al., 1996).

El Cd es un disruptor endocrino que está implicado en el deterioro de la esteroidogénesis (Henson & Chedrese, 2004). El Cd también disminuye la expresión del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), implicada en la internalización de colesterol, el primer paso en la esteroidogénesis (Jolibois, Burow, et al., 1999). En líneas de células de la granulosa porcina expuestas a dosis bajas de Cd, se observó una sobreexpresión genómica del CYP11A1 que codifica la *P450<sub>scc</sub>* (desmolasa implicada en la conversión de colesterol a pregnenolona). A dosis elevadas, se observó que el Cd inhibía la expresión de la *P450<sub>scc</sub>*, cuyo resultado producía una disminución en la síntesis de E2 (Smida, Valderrama, Agostini, Furlan, & Chedrese, 2004). Estos mismos autores comprobaron que el Cd además tenía un efecto inhibitorio sobre la expresión génica de 3- $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. La estructura química del Cd es parecida la del calcio, propiedad por la cual se facilita la interacción con las señales intracelulares del calcio (Lacroix & Hontela, 2006), y de este modo el Cd probablemente también participe en mecanismos de señalización intracelular de las hormonas FSH y LH. Sin embargo, el Cd también se observó que actuaba como un factor similar a los estrógenos, particularmente en los tejidos endocrinos (Stoica, Katzenellenbogen, & Martin, 2000). Esta propiedad se relaciona con su capacidad de enlace con los receptores estrogénicos (Nesatyy, Rutishauser, Eggen, & Suter, 2005), produciendo una mayor expresión de los genes estrogenodependientes (Darbre, 2006).

Por otro lado, el benzopireno también fue descrito como un disruptor endocrino (Inyang et al., 2003). En estudios experimentales, el benzopireno se observó que inhibía la expresión y la actividad de la aromatasas P450 (Dong, Wang, Thornton, Scheffler, & Willett, 2008), así como una disminución de la actividad de la 17- $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa y de la 17-20 liasa, enzimas implicadas en la esteroidogénesis (Rocha Monteiro, Reis-Henriques, & Coimbra, 2000). Como sucede con el Cd, el benzopireno presenta propiedades similares a los estrógenos (Gozgit, Nestor, Fasco, Pentecost, & Arcaro, 2004), debido a la semejanza estructural de los PAH a los esteroides sexuales. Por lo tanto, los PAH pueden actuar en los mismos sitios que las hormonas esteroideas (Charles et al., 2000). De todos modos, en tejido humano y particularmente en el tejido ovárico, los niveles y la biodisponibilidad del benzopireno son mucho más bajos, y aún no se ha podido demostrar que tengan in vivo un efecto similar a los estrógenos (Fertuck, Matthews, & Zacharewski, 2001).

Así pues, queda patente que determinados compuestos del humo del tabaco pueden actuar como disruptores endocrinos por varios mecanismos produciendo efectos tanto estrogénicos como antiestrogénicos. Estos efectos opuestos podrían explicarse por sus acciones en las diferentes etapas y diversos objetivos de la esteroidogénesis. La complejidad de los efectos de los compuestos del humo del tabaco debe ser más investigada para dilucidar mejor las consecuencias sobre la síntesis de hormonas esteroideas.

#### ○ Desarrollo embrionario preimplantacional

Varios metabolitos del humo del tabaco se han identificado en el embrión y en su entorno. El benzopireno ha sido detectado en el embrión en la etapa de 3 a 8 blastómeras, tanto en el citoplasma como en el núcleo (Zenzes, Puy, Bielecki, & Reed, 1999). La nicotina también se llegó a identificar en el endometrio y flujo cervical (Poppe, Peeters, Daenens, Ide, & Van Assche, 1995), sugiriendo que el desarrollo embrionario comenzó en un ambiente «tóxico». En cuanto a los conocimientos de los mecanismos y efectos de los compuestos del humo del tabaco sobre el desarrollo embrionario son más bien pobres. En un estudio evaluaron el espesor de la zona pelúcida en preembriones de mujeres expuestas frente a otras no expuestas al humo del tabaco, encontrando una zona pelúcida gruesa en las fumadoras (20,1 mm. de los fumadores versus 15,3 mm. en no fumadoras) (Shiloh et al., 2004). En otro estudio evaluaron el efecto del tabaquismo femenino en la calidad de los embriones de FIV y encontraron que el estatus de tabaquismo no tenía ninguna influencia en la puntuación de la morfología embrionaria, la tasa de fragmentación

y el bloqueo de embriones, sin embargo, se observó una menor tasa de fertilización en las fumadoras que en las no fumadoras (78.2 frente al 85,7%) (Gruber, Just, Birner, & Losch, 2008). En un estudio realizado usando ratones femeninos expuestos al humo del tabaco, encontraron que la tasa de crecimiento y de embriones no bloqueados en día +2 fue menor en los ratones expuestos en comparación con los controles (32 vs 75%); sin embargo, el día +3, la tasa de embriones bloqueados fue idéntica en los dos grupos (Hassa et al., 2007). En otro estudio evaluaron el desarrollo de embriones bovinos después de la exposición al humo del tabaco y encontraron una tasa elevada de blastómeras multinucleadas (Liu et al., 2008). En una investigación sobre el desarrollo preimplantacional de 1682 embriones de parejas que se sometieron a FIV, sorprendentemente, encontraron que la tasa de fertilización y la proporción de embriones de buena calidad se incrementaba con el aumento de los niveles de cotinina folicular. Según distintos autores, los resultados de este último estudio pueden explicarse por una acción de la cotinina mediada por una inhibición de la apoptosis en el desarrollo de los embriones en las fumadoras, con lo que tendrían una mayor capacidad para sobrevivir (Zenzes et al., 1999).

También se estudiaron los efectos del Cd en embriones de ratón y conejo. Aunque no se observó ningún efecto a bajos niveles de exposición, dosis altas condujeron a la degeneración embrionaria tipo necrosis (Yu, Tam, & Chan, 1985). En la etapa de blastocisto, el Cd induce necrosis de las células de la masa celular interna con aparición de vacuolas citoplasmáticas y cuerpos residuales (Abraham, Ringwood, & Mankes, 1984).

Los efectos de los PAH se estudiaron en embriones murinos, observándose que la exposición a estos compuestos conducía a una disminución en el número de células en embriones en fase de mórula y blastocisto, resultando una pérdida del 20% del número total de células en embriones expuestos a los PAH (Detmar et al., 2006). Los efectos del benzopireno, como expusimos con anterioridad, son mediados por la vía de los AhR. La expresión de los AhR se comprobó investigando embriones de conejo, llegando a observarse en las blastómeras en fase de mórula, en la masa celular interna en la fase de blastocisto y en las células del trofoblasto en estadios más avanzados (Tscheudschilsuren et al., 1999). Parece existir una gradual aparición de AhR durante el desarrollo embrionario y esta expresión, dependiente del tiempo, podría explicar los efectos tardíos de los componentes del humo del tabaco sobre el desarrollo embrionario. En un estudio, mencionado anteriormente realizado en embriones de ratón, observaron que la exposición a los PAH durante 24 h aumentó significativamente el nivel de transcripción de Bax (x2) y el nivel de

actividad caspasa en un 35% (Detmar et al., 2006) . En blastocistos de ratones expuestos al benzopireno, observaron en un estudio que existía un aumento en el intercambio de cromátides hermanas correlacionados con el aumento de exposición a este hidrocarburo (Pedersen, Meneses, Spindle, Wu, & Galloway, 1985). Diferentes moléculas contenidas en el humo del tabaco tienen propiedades diferentes pro-o y anti-apoptosis, lo cual conduce a un probable deterioro del desarrollo embrionario. El fenómeno de apoptosis creciente observado en estudios experimentales podría explicarse por los altos niveles de exposición. Estos niveles fueron probablemente más altos que los observados in vivo, explicando los resultados controvertidos observados en los estudios de fecundación in vitro. Mecanismos implicados en los efectos del humo sobre apoptosis embrionaria o supervivencia no quedan aclarados y se precisan más investigaciones.

- Trompas de Falopio

Respecto a la relación entre el humo del tabaco y el transporte del embrión y el COC a través de las trompas de Falopio, se planteó la hipótesis de que el oviducto podría considerarse como un objetivo de su efecto tras observar que existía una mayor tasa de *embarazos ectópicos* en mujeres expuestas, además, con riesgo dosis-dependiente (Bouyer, 2003; Karaer, Avsar, & Batioglu, 2006). Estas observaciones sugieren que el humo del tabaco podría tener consecuencias deletéreas sobre la función tubárica. Dejar de fumar parece ser beneficioso para la función de las trompas de Falopio, aunque siga suponiendo un riesgo de lesiones tubáricas crónicas e irreversibles. Aunque el análisis multivariado, con el ajuste de variables de confusión, a menudo ha revelado asociaciones entre humo del tabaco y embarazo ectópico, la afirmación de fumar como un sólido factor de riesgo debe hacerse con precaución. De hecho, fumar también se asocia con conductas de riesgo, tales como la ingesta de alcohol y la promiscuidad sexual, así como la enfermedad pélvica inflamatoria que son también factores de riesgo individuales para el embarazo ectópico .

El humo del tabaco puede provocar una disfunción tubárica que altera la migración del embrión y del COC a través de las trompas de Falopio, la cual puede verse afectada por cambios en la adhesión entre el COC o el embrión y el epitelio tubárico, la actividad ciliar o la contracción muscular tubárica. En oviductos de hámster expuestos al humo del tabaco se observó una disminución en la frecuencia del batido ciliar (FBC), una disminución en la recuperación de ovocitos y de las contracciones del músculo liso infundibuliforme (Knoll & Talbot, 1998), lo cual podría explicar el transporte anormal del embrión, así como su implantación ectópica. Todos los efectos negativos se observaron en

forma dosis dependiente (Riveles, Iv, Arey, & Talbot, 2003; Riveles, Tran, Roza, Kwan, & Talbot, 2007). Parece ser que la nicotina y la cotinina no son los principales compuestos involucrados en la disfunción tubárica, sin embargo, otros muchos componentes, tales como cianuro, piridina y derivados, y pirazina y derivados, sí que podrían estar implicados (Riveles, Roza, Arey, & Talbot, 2004). El cianuro tuvo efectos inhibitorios sobre la FBC en concentraciones que van de 50 a 100 mM., sugiriendo la implicación de este compuesto en la disfunción tubárica (Talbot, DiCarlantonio, Knoll, & Gomez, 1998). Los mecanismos implicados en el deterioro del batido ciliar siguen siendo mal entendidos. En experimentación animal, se ha observado que tras la exposición al humo del tabaco disminuía la cantidad de células ciliares y el ritmo de batida ciliar se hacía de manera defectuosa (discinesia ciliar) (Riveles, Roza, & Talbot, 2005). Algunos componentes del humo del cigarrillo interfieren con complejos proteicos implicados en la movilidad ciliar, como el axonema y la dineína o las señales del calcio mediadas por la vía de la proteína-kinasa, que podrían contribuir al deterioro de la actividad ciliar (Wyatt, Schmidt, Rennard, Tuma, & Sisson, 2000). En modelos animales, se demostró también que la FBC era dependiente de esteroides sexuales, actuando a través de receptores que fueron identificados en las células epiteliales ciliares (Shao et al., 2007). Como se expuso anteriormente, el humo, que actúa a través del deterioro de la esteroidogénesis, podría afectar también la actividad ciliar. La disminución en la tasa de recuperación de ovocitos podría explicarse por la anormal y mayor adhesividad entre el COC y el epitelio tubárico, llevando a una migración lenta del COC. Finalmente, se ha propuesto que una matriz extracelular anormal del COC también podría estar implicada en la relación anómala entre el COC y epitelio tubárico, la disminución en el número de ovocitos recuperados y la migración anormal a través de las trompas de Falopio (Vrsanska et al., 2003). Estos resultados podrían explicar fácilmente la función tubárica anormal y las mayores tasas de embarazo ectópico en pacientes fumadoras.

- Implantación embrionaria

La implantación del embrión requiere un endometrio adecuadamente preparado. El sitio y la calidad de la implantación juegan un papel importante en determinar el riesgo de morbilidad y mortalidad durante el embarazo. Tasas de implantación más bajas se observaron en las fumadoras que se sometieron a fecundación in vitro, aunque los resultados son controvertidos (Freour et al., 2008; Winter, Wang, Davies, & Norman, 2002). En modelos de donación de ovocitos humanos las tasas de implantación en los

receptoras fueron más bajas en fumadoras empedernidas (>10 cigarrillos/día) que en no fumadoras (25.8 y 32.3%, respectivamente) (Soares, Simon, Remohi, & Pellicer, 2007).

Los efectos del humo del tabaco en el endometrio no son bien conocidos. Utilizando ratas hembras expuestas a la nicotina, se estudió la decidualización endometrial mecánicamente inducida determinando el peso del útero, encontrándose que éste tenía un menor peso tras la administración de nicotina, con lo que se concluyó en que había un efecto adverso en el proceso de decidualización tras la exposición a dicho compuesto (Card & Mitchell, 1978). Usando células endometriales primarias de especímenes de histerectomías y de líneas de células epiteliales endometriales humanas, se estudiaron los efectos de una solución acuosa del humo del tabaco, observando una disminución significativa dependiente de la dosis en la proliferación endometrial, mediada por la vía del óxido nítrico (NO) (Khorram, Han, & Magee, 2010).

El *benzopireno* actúa a través de los AhR que existe en las células epiteliales y el estroma endometrial. Los niveles de AhR se demostró que varían durante el ciclo y el período peri-implantatorio (Kitajima et al., 2004). Una posible implicación de este receptor se demostró mediante un modelo de ratones knockout (KO) a AhR que se caracterizaban por la pérdida temprana del embarazo y muerte fetal intrauterina, lo que sugiere que AhR desempeña un papel en el mecanismo de implantación e invasión trofoblástica (Abbott et al., 1999). Interfiriendo con los citocromos involucrados en el metabolismo de los estrógenos, el benzopireno y los derivados de los PAH podrían actuar como un factor antiestrogénico, hasta el punto de comprometer la maduración endometrial (Bao, Vepakomma, & Sarkar, 2002; Fertuck et al., 2001). Este último autor, con células endometriales humanas inmortalizadas, investigó los efectos del benzopireno en la CYP1A1, un citocromo implicado en el catabolismo de los estrógenos, y demostró que la incubación con benzopireno aumentaba la expresión y actividad de esta enzima. Estas observaciones podrían explicar la maduración endometrial anormal. El *Cd* también podría alterar la maduración endometrial. En un estudio quedó demostrado que los modelos animales expuestos al *Cd* tenían un espesor endometrial aumentado a expensas de la capa epitelial e inflamación a nivel estromal (Zhang et al., 2007). En otro estudio sobre los efectos del *Cd* en cultivos de células estromales endometriales humanas, con la prolactina como marcador de decidualización, se comprobó la inducción de este proceso por dicho metal, lo cual indica que ésta podría haber sido una de las causas de las menores tasas de implantación en grandes fumadoras (Tsutsumi et al., 2009).

En cuanto a los efectos sobre la *angiogénesis endometrial*, la hipótesis de que compuestos del humo, particularmente el *benzopireno*, influyan en la misma, es apoyada firmemente por la presencia del AhR en las paredes de los vasos endometriales (Kitajima et al., 2004) y por la observación de las paredes hipertróficas de los vasos en ratones KO a AhR (Fernandez-Salguero, Ward, Sundberg, & Gonzalez, 1997). Así pues, existe una alta sospecha de un efecto inhibitorio en la proliferación de células endoteliales inducida por el benzopireno. Otro estudio sobre los efectos in vitro de humo del tabaco realizado en células endoteliales uterinas humanas y en la *PECAM-1*, una molécula de adhesión celular endotelial, encontró cambios en la morfología y movilidad de las células endoteliales humanas, un aumento de la expresión superficial de PECAM-1 y una localización aberrante de dicha molécula, lo cual sugiere una regulación aberrante del proceso angiogénico causado por compuestos de humo (Soghomonians, Thirkill, Mariano, Barakat, & Douglas, 2004). Los efectos de la *nicotina* sobre la angiogénesis han sido estudiados más exhaustivamente con placenta, en las últimas etapas del embarazo, donde la nicotina fue implicada en la activación de la proliferación y la migración de células endoteliales, presentando propiedades pro-angiogénicas, con el resultado de un mayor desarrollo capilar placentario (Cooke & Bitterman, 2004; Dasgupta & Chellappan, 2006). Los compuestos del humo parece que presentan propiedades tanto pro como antiangiogénicas, las cuales probablemente implican mecanismos complejos. Otros estudios son necesarios para entender y aclarar los mecanismos implicados en los efectos del humo sobre la angiogénesis, la alteración de la implantación del embrión y el desarrollo placentario temprano.

La *implantación* y la *placentación* temprana requieren de una serie de procesos secuenciales que consisten en la adhesión entre el blastocisto y el endometrio, la proliferación del trofoblasto, la diferenciación, la migración y la invasión. Usando células trofoblásticas humanas, quedó demostrado que los compuestos del cigarrillo disminuían la probabilidad de formación placentaria normal, la migración trofoblástica, la invasión y la diferenciación (Genbacev & Miller, 2000; Zdravkovic et al., 2006). Utilizando células de trofoblasto humano, se investigó la capacidad mitótica del citotrofoblasto, y se observó que existía una disminución dosis-dependiente de la capacidad mitótica y proliferativa después de exposición al humo. El primer autor del punto anterior, también estudió la posibilidad de migración por análisis in vitro del citotrofoblasto tras la adición de dosis crecientes de nicotina y encontró una reducción dosis-dependiente en la capacidad de migración y de invasión. La migración y la invasión requieren una interacción a nivel molecular entre la



superficie del trofoblasto y el endometrio. El receptor de la L-selectina y su ligando (un oligosacárido) están implicados en el proceso de adhesión de trofoblasto-endometrio (Genbacev et al., 2003), así como en la interacción entre las vellosidades del citotrofoblasto y el endometrio (Prakobphol, Genbacev, Gormley, Kapidzic, & Fisher, 2006). Otro estudio realizado en células endoteliales de capilares uterinos humanos observó que los compuestos del humo del tabaco disminuían la expresión de la quimioquina *RANTES* (“Regulated upon Activation Normal T-Cells Expressed and Secreted”), lo cual podría contribuir a la disminución de la probabilidad de implantación del embrión (Thirkill, Vedagiri, & Douglas, 2006). En las fumadoras, también se describieron niveles inferiores de *L-selectina* en células del trofoblasto y citotrofoblasto, explicando el empeoramiento de la adhesión y la interacción deletérea entre el endometrio y las células del citotrofoblasto (Zdravkovic et al., 2006). La Invasión trofoblástica es controlada por una serie de moléculas, tales como las metaloproteasas de la matriz extracelular (*MMP*), el factor de crecimiento epidérmico (*EGF*) y la *hCG* (Lala & Chakraborty, 2003; Staun-Ram, Goldman, Gabarin, & Shalev, 2004). En el tejido placentario de las fumadoras, se observaron menores niveles de MMP-9 en células del citotrofoblasto y la actividad de esta enzima se redujo en un 90% cuando se agregaron altas dosis de nicotina al medio de cultivo (Genbacev, Bass, Joslin & Fisher, 1995). En el promotor del gen MMP-1, un elemento de respuesta fue identificado como un objetivo de los compuestos del humo del tabaco, lo que sugiere que deben tener una influencia directa en la expresión génica de las MMP, lo que sugiere que los compuestos del humo tienen una influencia directa en la expresión del gen MMP (Mercer, Wallace, Brinckerhoff, & D'Armiento, 2009). Por otro lado, se observó que líneas de células trofoblásticas placentarias humanas expuestas al benzopireno demostraron una capacidad alterada para proliferar debido a una disminución tanto de EGF como la de su receptor (L. Zhang, Connor, Chegini, & Shiverick, 1995). La *hCG* es una hormona clave implicada en la receptividad endometrial y la invasión trofoblástica mediante regulación de las MMP (Fluhr et al., 2008). En las vellosidades libres, la fusión de citotrofoblasto está regulada por la hCG. Utilizando explantes placentarios humanos cultivados en vitro, se observó que la secreción de hCG por las células del trofoblasto se modificaba por la acción de los compuestos del humo del tabaco, así, cuando se exponía a dosis bajas de Cd o benzopireno, la amplitud de pulso de hCG y su secreción aumentaron y, en cambio, en el caso de altas dosis de Cd, la amplitud de pulso de hCG fue inhibida (Barnea & Shurtz-Swirski, 1992; Boadi et al., 1992). Una modificación del perfil de la secreción de hCG, dependiendo de los



compuestos del humo y el nivel de exposición, podría explicar los diferentes grados de deterioro de la implantación, así como la complejidad de las anomalías descritas.

- Flujo en arteria uterina

Durante el ciclo menstrual se producen cambios en la velocidad del flujo de sangre en la arteria uterina. Durante la ventana de implantación en la arteria uterina se observa un índice de pulsatilidad bajo y una velocidad de flujo alta (Sladkevicius, Valentin, & Marsal, 1993; S. L. Tan, Zaidi, Campbell, Doyle, & Collins, 1996). Goswamy introdujo el concepto de infertilidad relacionados con el deterioro vascular.

Existen controversias en los trabajos publicados en cuanto a la relación de los efectos del humo del tabaco, la alteración del flujo sanguíneo uterino y endometrial y el empeoramiento de los resultados de las pacientes sometidas a FIV (Hoozemans, Schats, Lambalk, Homburg, & Hompes, 2008; Ng, Chan, Tang, Yeung, & Ho, 2007). No obstante, varios autores han demostrado que alteraciones del flujo arterial uterino estudiados con velocimetría Doppler se asociaron con una menor tasa de implantación en pacientes sometidas a FIV (Dechaud et al., 2008; Merce, Barco, Bau, & Troyano, 2008). Son necesarios más estudios para confirmar los efectos de los componentes del humo del tabaco en el flujo arterial uterino y sería conveniente investigar su potencial efecto sobre las arterias espirales y sus consecuencias sobre la implantación.

- Actividad miometrial

El útero se caracteriza por las contracciones miométriales que varían dependiendo de la fase del ciclo, influenciado principalmente por el status hormonal (Bulletti et al., 2000; Kunz & Leyendecker, 2002; Lyons et al., 1991). Un estudio demostró que una frecuencia alta de contracciones miométriales en el día de la transferencia de embriones en una FIV se asoció con niveles más bajos de *progesterona* en plasma y menores tasas de implantación, lo que sugiere el importante papel de la relajación miometrial durante el proceso de implantación jugado por la progesterona para realizar esta acción (Fanchin et al., 1998). El potencial efecto del tabaquismo sobre la actividad miometrial sigue siendo mal entendido. Sin embargo, se sospechó un efecto negativo de los compuestos del humo del tabaco sobre la actividad miometrial basándose en el incremento de las tasas de amenaza de parto prematuro y prematuridad en mujeres embarazadas que fuman (Jaddoe et al., 2008).

Además de la disminución de la síntesis de progesterona, se produce también, como demuestran algunos estudios en ratas y humanos, un aumento de la liberación de oxitocina, un aumento de la síntesis de sus receptores y un aumento de la sensibilidad a la misma en las células miométriales (Egawa et al., 2003; Nakamoto et al., 2006). Además, el *Cd*, como se expuso anteriormente, podría aumentar la actividad contráctil uterina a través de la vía del calcio. No obstante, se necesitan más estudios para aclarar los efectos del tabaco sobre la relajación uterina.

○ Factores moduladores del efecto del tabaco

Muchos factores podrían explicar diversas consecuencias observadas en los diferentes estudios realizados como son el hábito de fumar, la sensibilidad individual, la interacción con otras sustancias tóxicas, la presencia del humo de tabaco ambiental y, el tiempo y la duración de la exposición. Todos estos estudios analizan los cambios observados en la dosis-respuesta según la forma de fumar, las diferencias raciales, de sexo, de IMC, el consumo paralelo de otras sustancias tóxicas como el alcohol y la importancia del “fumador pasivo” (Klonoff-Cohen, Natarajan, Marrs, & Yee, 2001; Lessov-Schlaggar, Benowitz, Jacob, & Swan, 2009; Lutterodt, Rosendahl, Yding Andersen, Skouby, & Byskov, 2009; Swan & Lessov-Schlaggar, 2009).

Las dosis usadas en los estudios experimentales probablemente no se corresponden con los niveles de las sustancias tóxicas en sangre y tejidos humanos. Por otra parte, la duración y las vías de administración son también diferentes. Se suele examinar sólo un compuesto en cada uno de los estudios experimentales, pero los seres humanos están expuestos a más de 4000 compuestos del humo del tabaco. Debido a las limitaciones de los estudios en animales, la extrapolación a humanos de las observaciones debe llevarse a cabo con gran cautela. Sin embargo, estudios experimentales confirman los efectos nocivos observados en estudios en humanos, lo que nos permite comprender mejor los efectos negativos del tabaquismo sobre la función reproductiva y los mecanismos implicados.

#### 1.11.5.5. ALCOHOL

El elevado consumo de alcohol ha mostrado tener un efecto negativo en la fertilidad de la mujer y del varón (Klonoff-Cohen, Lam-Kruglick, & Gonzalez, 2003). En hombres, el consumo de alcohol puede inducir atrofia testicular, impotencia, reducción de la libido y causar un deterioro cualitativo y cuantitativo en los espermatozoides (Muthusami & Chinnaswamy, 2005). En las mujeres, el alcohol puede alterar los niveles de estrógenos y progesterona, también se ha asociado con anovulación, disfunción de fase lútea y un deterioro en la implantación y el desarrollo del blastocisto (Gill, 2000). Sin embargo, no está claro desde la evidencia científica, qué nivel de consumo de alcohol tendría un efecto deletéreo sobre la fertilidad al existir la ausencia de una estimación universal de un estándar de bebida y al hecho de que los datos son extraídos frecuentemente de estudios retrospectivos, por lo que conllevan un sesgo importante a tener en cuenta (Mukherjee, Hollins, Abou-Saleh, & Turk, 2005). Un estudio europeo multicéntrico de más de 10 000 parejas con alto consumo de alcohol (más de 8 bebidas a la semana) mostró una disminución significativa de la tasa de fecundidad (Olsen, Bolumar, Boldsen, & Bisanti, 1997). Por otro lado, algunos estudios adicionales, no han demostrado un efecto deletéreo sobre la fertilidad si el consumo de alcohol es moderado (Curtis et al., 1997; Juhl, Nyboe Andersen, Gronbaek, & Olsen, 2001), incluso se ha llegado a observar una asociación dosis – respuesta positiva entre el consumo modesto de alcohol y la fertilidad (Hakim, Gray, & Zacur, 1998; Jensen et al., 1998). Finalmente, la ingesta de alcohol durante el embarazo ha mostrado conocidos efectos adversos, tales como el aumento del riesgo de aborto espontáneo, de parto prematuro, de restricción del crecimiento intrauterino con recién nacidos de bajo peso, de muerte fetal, de un amplio número de malformaciones e incluso del síndrome alcohólico fetal (Mukherjee et al., 2005; Windham, Fenster, & Swan, 1992). Dados los datos disponibles sobre alcohol, fertilidad y embarazo, así como el hecho de que el feto es más vulnerable a los efectos de la exposición del alcohol durante las primeras semanas después de la concepción, cuando puede que la mujer ni si quiera sepa que está embarazada, la última recomendación es tratar que las parejas eviten el consumo de alcohol si están buscando un embarazo y que la mujer se abstenga por completo durante toda la gestación (Collier, Tingle, Paxton, Mitchell, & Keelan, 2002; Guerrini, Jackson, & Keaney, 2009; Hakim et al., 1998; Homan et al., 2007; K. Johnson et al., 2006; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive & Infertility, 2008).

En cuanto a las unidades de medida para el consumo de alcohol se han estandarizado en *UBE* (unidad de bebida estándar) (Tabla 16) con el objeto de obtener valores de referencia para facilitar su registro y así poder realizar estudios comparativos (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad)).

**Tabla 16.** Equivalencia en UBE de las bebidas alcohólicas

Bebida	Consumición habitual	Equivalencia en UBE
Cerveza (3°-5°)	Un quinto/una caña (200 cc)	1 UBE
	Un litro	5 UBE
Vino, cava (12°-14°)	Un vaso (100 cc)	1 UBE
	Un litro	10 UBE
Carajillo	25 cc	1 UBE
Vino dulce/jerez/vermut (18°-20°)	Una copa (50 cc)	1 UBE
Destilados (40°-50°)	Una copa (50 cc)	2 UBE
	Un combinado (50 cc)	2 UBE

El valor de una UBE en España se establece en 10 gramos de alcohol.

#### 1.11.5.6. CAFEINA

La *cafeína*, un neuroestimulante de acción intermedia, es la sustancia popular farmacológicamente activa de mayor consumo en todo el mundo. La cafeína se encuentra en varios alimentos y bebidas, incluyendo café, té, chocolate, productos del cacao, bebidas refrescantes y energéticas y, también está presente en algunos medicamentos de venta libre, como antigripales y anticatarrales, tratamientos de alergia y cefaleas, pastillas para adelgazar, estimulantes y diuréticos. La mayoría de los estudios sobre la influencia de la cafeína en la esfera reproductiva presentan resultados contradictorios y deberían interpretarse con cautela debido a numerosas carencias metodológicas, como la estimación inexacta del consumo de cafeína; sesgo de memoria por evaluación retrospectiva de la ingesta de cafeína; no permiten distinguir las variaciones individuales en el metabolismo de la cafeína y además, no realizan un control adecuado de los factores de confusión. La evidencia sugiere que el consumo de cafeína se asocia con un tiempo incrementado para

lograr la concepción, con un posible efecto dosis-respuesta (Bolumar, Olsen, Rebagliato, & Bisanti, 1997). Sin embargo, cuando se ajustan de forma adecuada el consumo de cafeína con otros factores de estilo de vida relacionados con la fertilidad, particularmente la edad de la mujer, el consumo de tabaco o el de alcohol, existe escasa evidencia para apoyar que un consumo de cafeína leve – moderado tenga un efecto negativo sobre la fertilidad (Leviton & Cowan, 2002; Nawrot et al., 2003; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive & Infertility, 2008). Los datos sobre el efecto de la ingesta de cafeína en parejas estériles como una subpoblación son escasos e inconclusos (Homan et al., 2007; Klonoff-Cohen et al., 2003). Las revisiones de la literatura, una vez salvados los problemas metodológicos, concluyen en que una asociación causal entre el consumo de cafeína y el riesgo de aborto espontáneo no ha quedado demostrada y que el consumo materno de menos de 200-300 mg diarios de cafeína es improbable que aumente el riesgo de aborto espontáneo o produzca efecto adverso sobre el crecimiento fetal (Binns, Lee, & Fraser, 2008; Higdon & Frei, 2006; Leviton & Cowan, 2002; Nawrot et al., 2003).

Según reflejan los datos revisados sobre los efectos de la cafeína en la salud humana, el consumo moderado de esta sustancia a una dosis no superior de 400 mg al día no está asociado con la producción de ningún daño en el adulto (Binns et al., 2008; Higdon & Frei, 2006; Nawrot et al., 2003; van Dam, 2008). El nivel seguro de consumo de cafeína durante el embarazo sigue siendo un tema de debate. No obstante, para no sobrepasar el dintel de seguridad, sería prudente recomendar a las mujeres que están tratando de concebir y a aquellas que ya están embarazadas que reduzcan el consumo de cafeína por debajo de 100-200 mg. al día, lo que equivale a una o dos tazas de café diarias (Higdon & Frei, 2006; Homan et al., 2007; Klonoff-Cohen, Bleha, & Lam-Kruglick, 2002; Knight, Knight, Mitchell, & Zepp, 2004; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive & Infertility, 2008). El estado actual de la medicina basada en la evidencia no justifica la completa abstinencia de bebidas que contienen cafeína antes o durante el embarazo.

#### **1.11.5.7. DROGAS DE ABUSO**

El uso de drogas ilegales antes de la concepción ha sido asociado con una reducción de la fertilidad tanto en hombres como en mujeres. Además, se ha observado un mayor riesgo de resultados adversos durante la gestación (Frey, Navarro, Kotelchuck, & Lu,

2008; Mueller, Daling, Weiss, & Moore, 1990; Park, McPartland, & Glass, 2004). Por razones de ética la información basada en la evidencia sobre los efectos de las drogas de abuso en la reproducción humana es escasa y su investigación ha sido llevada a cabo fundamentalmente en modelos de experimentación animal. Los estudios disponibles realizados en humanos poseen una serie de sesgos derivados un mal control de embarazo, un estatus socioeconómico bajo, acompañamiento de un consumo excesivo de alcohol y la utilización generalmente de más de una droga. Todos estos factores, en conjunto e individualmente, pueden influir en un deterioro de la función reproductiva. A continuación expondremos algunos estudios realizados sobre la marihuana, los opiáceos y la cocaína.

La *marihuana* es la droga de recreo de mayor consumo en el mundo (Battista, Pasquariello, Di Tommaso, & Maccarrone, 2008). Esta droga contiene varios componentes activos llamados *cannabinoides* que actúan tanto en el sistema nervioso central como en el periférico e interfieren con la función reproductiva a varios niveles. Los receptores cannabinoides se encuentran en varios lugares, incluyendo los órganos reproductivos, como los ovarios, el útero, los conductos deferentes y los testículos. La administración aguda de marihuana en las mujeres reduce los niveles de LH, mientras que el uso crónico conduce a la tolerancia farmacológica y, por tanto, ausencia de cambios hormonales (Park et al., 2004). Los cannabinoides pueden afectar a la fertilización, al transporte tubárico, al desarrollo fetal y placentario, predominantemente a través de una alteración de las vías de señalización involucradas en los procesos reproductivos y también provocando una disregulación hormonal (Battista et al., 2008; Rossato, Pagano, & Vettor, 2008). Se ha observado un riesgo aumentado de esterilidad primaria en mujeres que consumen regularmente marihuana en comparación con las que no lo hacen (RR 1,7, 95% IC = 1.0-3.0) (Mueller et al., 1990). Los cannabinoides ejercen una influencia negativa sobre la espermatogénesis mediante la alteración de la modulación de la apoptosis espermática llevada a cabo por las células de Sertoli, la reducción de la producción de testosterona por las células de Leydig, la inhibición de la motilidad espermática, así como la alteración de la capacitación y la reacción acrosómica (Battista et al., 2008). Los cannabinoides no afectan la fertilización de los ovocitos (Battista et al., 2008). La exposición fetal intraútero a la marihuana se correlaciona con recién nacidos de bajo peso (Fride, 2008; Park et al., 2004), prematuridad, anomalías congénitas y mortinatos (Mueller et al., 1990; Park et al., 2004). También se ha observado un leve deterioro de la función cognitiva superior en edades posteriores (Fride, 2008).

Los datos existentes en humanos sobre opiáceos y la función reproductiva en mujeres son equívocos y no concluyentes por lo que no lo vamos a tratar. En cuanto al varón, se ha observado en heroinómanos una disfunción eréctil que persiste incluso tras el abandono de la droga (C. Wang, Chan, & Yeung, 1978). Estudiando los parámetros seminales, todos se vieron afectados, predominantemente la motilidad, en la mayoría de los heroinómanos y en menor medida en los usuarios de metadona (Ragni et al., 1985). En cuanto al eje gonadal hormonal de los adictos a opiáceos se ha observado que mantienen normales los niveles serológicos de gonadotropinas, sufren una elevación significativa de la prolactina y se produce una disminución de la testosterona tanto total como libre (Ragni et al., 1985).

En cuanto a la *cocaína*, se ha observado en primates que empeora la respuesta ovárica a las gonadotropinas exógenas y también afecta a la espermatogénesis en roedores (George et al., 1996; Thyer et al., 2001). No existen estudios en humanos que avalen estos hallazgos.

La *heroína* y la *cocaína* durante el embarazo han mostrado un riesgo elevado de aborto placentae, parto prematuro, recién nacidos de bajo peso, mortalidad neonatal, síndrome de abstinencia neonatal y posibles efectos a largo plazo de trastornos conductuales y neurológicos. Bien es cierto que estos riesgos también pueden asociarse a otros factores de confusión como pueden ser la deficiente atención prenatal y la combinación con otras sustancias, por lo que no podemos desde la evidencia atribuirlos exclusivamente a la cocaína o a la heroína sin tener en cuenta todo lo demás (Hulse, Milne, English, & Holman, 1998; Richardson, Day, & McGauhey, 1993). Con todo, basándonos en la evidencia disponible, debemos recomendar a todas las parejas que desean concebir y a todas las mujeres embarazadas que se abstengan del consumo de drogas de recreo (K. Johnson et al., 2006; Park et al., 2004).

#### **1.11.5.8. ESTRÉS OXIDATIVO**

Un creciente número de evidencias sugiere que algunos estilos de vida y factores medioambientales influyen en el sistema reproductor tanto del hombre como de la mujer a través de un mecanismo de estrés oxidativo (Figura 1)(Ruder, Hartman, Blumberg, & Goldman, 2008; Tremellen, 2008). Se ha comprobado en numerosos estudios que tanto la reducción de la *actividad antioxidante* como la sobreproducción de *radicales libres* está



presente tanto en varones como en mujeres estériles (Ruder et al., 2008; Tremellen, 2008). Se ha encontrado una elevación de marcadores de estrés oxidativo en suero de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP), en fluido peritoneal de las trompas de Falopio en la mujer con esterilidad de origen desconocido (EOD), en hidrosálpinx y, aunque de forma inconsistente, también en mujeres que sufren de endometriosis (Bedaiwy et al., 2002; Polak, Koziol-Montewka, Gogacz, Blaszkowska, & Kotarski, 2001). Con la disminución de la capacidad antioxidante se produce un aumento de las *especies reactivas del oxígeno (ROS)* que a su vez llevaría a una sobreproducción de radicales libres y, como consecuencia, los estudios realizados sugieren que en el varón podrían causar un daño en el espermatozoide por dos mecanismos, bien por un daño de membrana con el consecuente deterioro de la motilidad espermática y la capacidad de fecundar al ovocito, o produciendo un daño en el ADN aumentando la fragmentación del mismo (Tremellen, 2008). Una reciente evidencia relaciona el estrés oxidativo con el varicocele asociado a infertilidad masculina (Agarwal et al., 2009). En la mujer, el efecto del estrés oxidativo sobre la fertilidad sugiere unos mecanismos más complejos y permanece actualmente insuficientemente investigado.

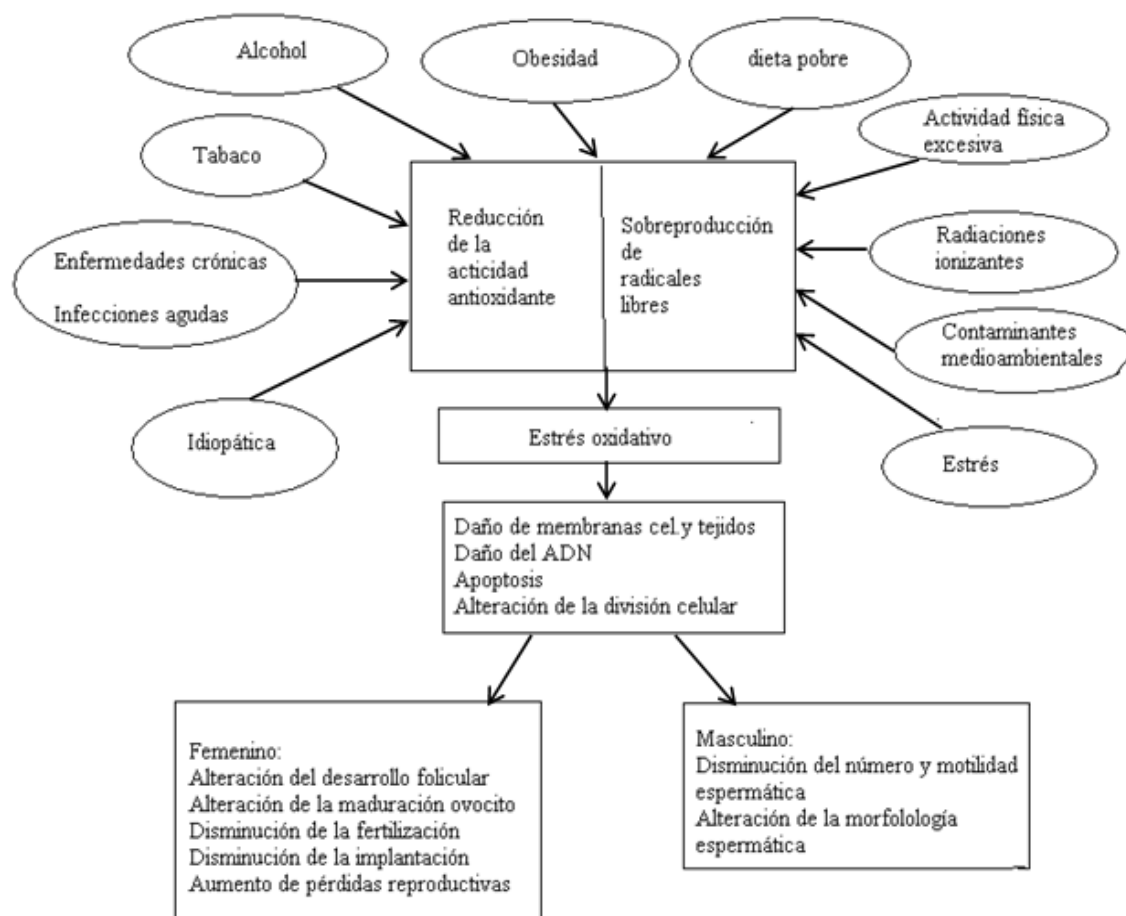
En la actualidad, las investigaciones, promovidas por la industria farmacéutica, se encuentran focalizadas en la asociación entre la dieta pobre en antioxidantes y la producción de estrés oxidativo, con sus consecuentes resultados adversos. En estudios con animales se ha observado que suplementando la dieta con antioxidantes tales como la vitamina E, la vitamina C y el manganeso, se produce un estímulo de la liberación de gonadotropinas y se promueve el crecimiento fetal (Ruder et al., 2008). La evidencia en humanos no es concluyente ya que existe una carencia de estudios bien diseñados con ensayos clínicos a largo plazo que evalúen el efecto de los antioxidantes en la función reproductiva en general y en la población estéril en particular.

Los suplementos dietéticos de antioxidantes tales como la vitamina E, la vitamina C, los ácidos grasos esenciales omega 3 tipo ácido docosahexaenoico (DHA), la acetilcisteína, el zinc, el selenio, los betacarotenos y la combinación de todos ellos, fueron asociados con una disminución del daño en el ADN espermático medido por el porcentaje de fragmentación, una reducción del estrés oxidativo medido por los marcadores de las ROS y una mejoría en la calidad espermática medida por el seminograma y la capacitación (REM) (Tremellen, 2008).

A pesar de la creciente evidencia sobre el efecto beneficioso de los antioxidantes, existen datos insuficientes para concluir en que este tipo de tratamiento



mejore las tasas de embarazo y reduzca el riesgo de los resultados adversos durante la gestación (Agarwal et al., 2009; Ebisch, Thomas, Peters, Braat, & Steegers-Theunissen, 2007; Ruder et al., 2008; Tremellen, 2008). En el tratamiento de la esterilidad masculina permanece incierto cual sería el objetivo y cómo deberían ser seleccionados teniendo en cuenta la combinación más eficiente, la dosis necesaria y la duración del tratamiento (Tremellen, 2008). Basándonos en la actual limitada evidencia, la terapia antioxidante en mujeres estériles no debería ser utilizada de forma indiscriminada, así que, no se recomienda su uso de forma rutinaria (Agarwal et al., 2009). Recientemente, se están realizando estudios sobre la **melatonina** tanto en animales como en humanos, donde se ha comprobado un efecto *antiapoptótico* al modular la expresión de *Bcl-2* y *BAX* y un poder *antioxidante*, en este sentido, hay en marcha un ensayo clínico randomizado a doble ciego llamado melatonina en tratamientos de reproducción asistida (*MIART*) cuyos resultados parecen prometedores (Dehghani-Mhammadabadi et al., 2014; Fernando, Osianlis, Vollenhoven, Wallace, & Rombauts, 2014). No obstante, son necesarios más estudios en esta área para evaluar si los marcadores de estrés oxidativo son necesarios para sacar conclusiones firmes y así poder establecer recomendaciones adecuadas (Fig. 33).



**Figura 33.** El rol del estrés oxidativo en fertilidad.

#### 1.11.6. Consideraciones finales sobre toxicidad y fertilidad.

Una persona en edad fértil que busca tener un hijo sano debe considerar incidir sobre los factores de riesgo modificables. La evidencia nos enseña que el efecto de la obesidad, la ingesta de folatos y el consumo de tabaco sobre la salud reproductiva es concluyente. Respecto a las vitaminas, el alcohol, la cafeína y los antioxidantes, la literatura es confusa y puede ser difícil de interpretar. Sin embargo, sí que está claro que la ingesta moderada de alcohol o cafeína no ha mostrado efectos adversos sobre la fertilidad y que el efecto beneficioso de la ingesta de antioxidantes puede ser prometedor. A pesar de la evidencia insuficiente acerca del efecto exacto sobre la fertilidad de las drogas de recreo o de la exposición a contaminantes ambientales, estos factores deberían ser evitados debido a los conocidos efectos perjudiciales que tienen sobre la salud en general. Existe una

concienciación cada vez mayor acerca de los efectos negativos del estrés sobre la fertilidad, lo cual está promoviendo una serie de estudios orientados a las terapias liberadoras de estrés dirigidos a la población estéril.

Todos sabemos que la esterilidad es un problema prevalente que tiene consecuencias significativas tanto para la persona que la padece como para la comunidad. Sería conveniente además realizar una consulta de asesoramiento preconcepcivo para intentar corregir los factores de riesgo modificables basados en la evidencia con lo que deberíamos incidir en la importancia de realizar cambios positivos para mejorar la oportunidad de lograr un hijo vivo y sano. Adicionalmente, hay que intentar deshacer los mitos con restricciones innecesarias o conductas irracionales que sufren las parejas durante largos periodos de tiempo intentando tener un hijo sano. La elaboración de guías clínicas acerca de los estilos de vida y la contaminación ambiental sería un buen paso para ayudar a los clínicos a implementar mejor los cuidados preconcepcionales.

## **II.**

## **HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



## 2.1. HIPÓTESIS

Existe la posibilidad de realizar la cuantificación de tóxicos medioambientales y de consumo, tanto en *líquido folicular* (*matriz biológica de referencia a exposición*), como en *pelo* (*matriz biológica alternativa de referencia a exposición*), y, de esta forma, obtener información para correlacionar los resultados y así poder predecir las consecuencias derivadas de la exposición del ovocito a sustancias que se asocian al deterioro de la función reproductiva de la mujer a partir de una muestra orgánica de fácil acceso en las pacientes que van a ser sometidas a una FIV (fecundación in vitro).

## 2.2. Preguntas de investigación

- ¿Es el líquido folicular una matriz biológica adecuada para la estimación de la exposición a tóxicos?
- ¿Se correlacionan los niveles detectados de tóxicos en líquido folicular con los niveles detectados en el pelo de la mujer (matriz de referencia alternativa)?.
- ¿Influyen los niveles de tóxicos detectados en líquido folicular en las tasas de gestación, de abortos y en los resultados perinatales?

## 2.3. Justificación del estudio

Conocida la prevalencia elevada de exposición a sustancias tóxicas, la infradeclaración de la misma mediante cuestionario, sus efectos sobre la tasa de fecundación, embriogénesis e implantación, y el gasto sanitario que generan, sería conveniente conocer la exposición ovocitaria a dichas sustancias.

## 2.4. Objetivos

### 2.4.1. *Objetivos generales principales*

**2.4.1.1.** Determinación de tóxicos en líquido folicular ovárico, obtenido mediante punción y en el pelo en el contexto de técnicas de reproducción asistida.

**2.4.1.2.** Comparar los resultados en líquido folicular (matriz de referencia de exposición) con los obtenidos en pelo.

**2.4.1.3.** Comparar los resultados en líquido folicular y pelo con los obtenidos por cuestionario.

**2.4.1.4.** Evaluar las tasas de embarazo por punción y por transferencia en este grupo de pacientes.

**2.4.1.5.** Evaluar las tasas de recién nacidos vivos y los resultados perinatales.

#### **2.4.2.      *Objetivos generales secundarios***

(1) Determinar la prevalencia en la muestra de la exposición a tóxicos en mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida (TRA).

(2) Desarrollar y validar la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución para la determinación de tóxicos ambientales (metales pesados y en el futuro otras sustancias de interés) en líquido folicular.

#### **2.4.3.      *Objetivos específicos***

**2.4.3.1.** Determinación en el laboratorio de Espectrometría las concentraciones de As, Cd, Hg y Pb en líquido folicular y pelo en las pacientes estériles seleccionadas sometidas a FIV.

**2.4.3.2.** Estudiar las distribuciones de las concentraciones en líquido folicular y pelo de As, Cd, Hg y Pb. y a continuación, determinar si existe correlación de las concentraciones de estos metales pesados en las dos matrices biológicas de estas pacientes.

**2.4.3.3.** Evaluar la posible relación existente entre la variación de las concentraciones de As, Cd, Hg y Pb en el líquido folicular y las variables independientes y dependientes expresadas a continuación.

#### **➤      Variables independientes:**

**a.      *Variables de la paciente:*** edad de la mujer, IMC (índice de masa corporal), media de ciclos realizados, media de ciclos cancelados, niveles hormonales

basales durante el último año de FSH, LH, estradiol, prolactina, TSH, y tiempo de evolución de la esterilidad.

**b. Variables de estilos de vida:** nivel académico, lugar de residencia, lugar de trabajo, tipo de trabajo, antigüedad laboral, consumo de café, tabaco, exposición al humo, alcohol, ejercicio físico, jardinería, bricolaje, desplazamientos a pie, consumo de ensalada, carne, pescado en general y atún en particular, marisco y moluscos, y latas de conservas.

**c. Variables del estado de salud de la paciente:** antecedentes médicos y quirúrgicos.

**d. Variable de causas de esterilidad:** anovulación/SOP, edad avanzada, endometriosis, baja respuesta, factor tubárico, factor uterino, EOD, factor masculino y esterilidad mixta.

**e. Variables de tratamiento médico para la estimulación ovárica:** tipo de protocolo aplicado, dosis de FSH, días de FSH, ajuste de dosis de FSH, días de LH, ajuste de dosis de LH, tipo de respuesta y uso de adyuvantes.

➤ **Variables dependientes**

- a. Concentración de As en líquido folicular.
- b. Concentración de Cd en líquido folicular.
- c. Concentración de Hg en líquido folicular.
- d. Concentración de Pb en líquido folicular.
- e. Concentración de As en pelo.
- f. Concentración de Cd en pelo.
- g. Concentración de Hg en pelo.
- h. Concentración de Pb en pelo.

**2.4.3.4.** Evaluar la posible relación existente entre las variaciones de la concentración de As, Cd, Hg y Pb entre el pelo y las variables independientes y dependientes que a continuación se expresan.

➤ **Variables independientes:**

a. **Variables de la paciente:** edad de la mujer, IMC (índice de masa corporal), media de ciclos realizados, media de ciclos cancelados, niveles hormonales basales durante el último año de FSH, LH, estradiol, prolactina, TSH y tiempo de evolución de la esterilidad.

b. **Variables de estilos de vida:** nivel académico, lugar de residencia, lugar de trabajo, tipo de trabajo, antigüedad laboral, consumo de café, tabaco, exposición al humo, alcohol, ejercicio físico, jardinería, bricolaje, desplazamientos a pie, consumo de ensalada, carne, pescado en general y atún en particular, marisco y moluscos, y latas de conservas.

c. **Variables del estado de salud de la paciente:** antecedentes médicos y quirúrgicos.

d. **Variable de causas de esterilidad:** anovulación/SOP, edad avanzada, endometriosis, baja respuesta, factor tubárico, factor uterino, EOD, factor masculino y esterilidad mixta.

e. **Variables de tratamiento médico para la estimulación ovárica:** tipo de protocolo aplicado, dosis de FSH, días de FSH, ajuste de dosis de FSH, días de LH, ajuste de dosis de LH, tipo de respuesta y uso de adyuvantes.

➤ **Variables dependientes**

- a. Concentración de As en líquido folicular.
- b. Concentración de Cd en líquido folicular.
- c. Concentración de Hg en líquido folicular.
- d. Concentración de Pb en líquido folicular.
- e. Concentración de As en pelo.
- f. Concentración de Cd en pelo.
- g. Concentración de Hg en pelo.
- h. Concentración de Pb en pelo.



**2.4.3.5.** Determinar la influencia de las variaciones en la concentración de As, Cd, Hg y Pb en pelo, como predictor de la exposición del ovocito, en los resultados de la FIV, ajustando los mismos con las variables de la paciente, de los estilos de vida, del estado de salud, de las causas de esterilidad y los tratamientos médicos realizados. Los resultados de la FIV serán evaluados según el número de folículos punccionados, la tasa de recuperación de ovocitos, la tasa de madurez ovocitaria, el número de embriones generado, la ratio de embriones de calidad óptima, la ratio de embriones de calidad subóptima, la calidad y número medio de células de los embriones transferidos, la tasa de gestación, la tasa de abortos, la tasa de recién nacidos vivos, la tasa de prematuridad, la tasa de recién nacidos de bajo peso y la tasa de recién nacidos con secuelas.



### 3.1. MUESTRA DE PACIENTES Y MARCO DE ESTUDIO

#### 3.1.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional transversal con muestreo consecutivo, en el que se incluyen las pacientes a las que se les practica una punción ovárica folicular para TRA en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Regional y Universitario de Málaga. A estas mujeres se les pasa un cuestionario para conocer sus datos sociodemográficos y su posible exposición a sustancias tóxicas (tabaco, alcohol, pesticidas, metales pesados y hábitos alimentarios).

#### 3.1.2. Ámbito

Hospital Regional Universitario de Málaga): recogida de las muestras y realización de cuestionarios.

#### 3.1.3. Sujetos participantes

Todas las pacientes a las que se les practiquen una punción ovárica folicular para FIV y que hayan consentido participar en el estudio. Las participantes a su vez deben cumplir una serie de requisitos para acceder a las TRA en el sistema sanitario público andaluz, lo cual conlleva intrínsecamente unas limitaciones en la población de estudio. Así pues, la selección de la población elegible en nuestro caso no contempla el universo estadístico ideal para este estudio ya que partimos de los criterios de inclusión de la Guía de Reproducción Asistida del Servicio Andaluz de Salud:

- **Edad** entre 18 y 40 años.
- Mujer con edad mayor o igual de 38 años pasa directamente a FIV.
- Tiempo de evolución de la esterilidad de más de 1 año.
- Fracaso de 4 inseminaciones intrauterinas (IIU) tanto de semen de su pareja como de donante de banco.
- Nueva pareja con esterilización previa de alguno de los 2 miembros sin ningún hijo vivo y sano en común.
- Esterilidad e infertilidad primaria exclusivamente.

- Parejas con esterilización voluntaria previa que no posean ningún hijo en común.
- Mujer sola con deseo reproductivo que no cumpla criterios de IIU con donante de semen de banco.
- Se excluye toda pareja con al menos un hijo sano en común, incluso adoptado.
- Ausencia de enfermedad grave que contraindique el procedimiento.
- Enfermedad monogénica transmisible subsidiaria de diagnóstico genético preimplantación (DGP)I que sería realizado en el Hospital Virgen de Rocío de Sevilla.
- Enfermedad infecto-contagiosa con riesgo de transmisión horizontal y vertical como son la Hepatitis B, la Hepatitis C y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido. El ciclo de fecundación in vitro con transferencia embrionaria y criopreservación de embriones, si procediese, sería realizado en un centro capacitado con un laboratorio de alta seguridad biológica, que en el caso de la comunidad autónoma andaluza está ubicado en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada.
- Ovarios técnicamente inaccesibles.

#### **3.1.4. Criterios de inclusión y exclusión:**

##### **➤ Inclusión:**

- Consentimiento informado para participar.
- Cualquier paciente que vaya a ser sometida a un ciclo de FIV en la Unidad de Reproducción Humana del HRU de Málaga.

##### **➤ Exclusión:**

- Negativa a participar en el estudio.
- Dificultades de comunicación que impidan las entrevistas o la comprensión de los objetivos y alcance del estudio.
- Imposibilidad de obtener muestras válidas para el estudio.

#### **3.1.5. Periodo de estudio**

Del 3 de febrero de 2014 al 10 de marzo de 2015.

### 3.1.6. Estimación del tamaño muestral

Se trata de un *estudio observacional transversal* en el que se incluirán las pacientes estériles seleccionadas por *muestreo consecutivo* a las que se les practica una punción ovárica folicular en el Hospital Regional y Universitario de Málaga en el periodo de 1 año. En este estudio se recogen 13 meses para compensar las pérdidas de casos de la población elegible debido a la disminución de la actividad de la UR del hospital en los periodos vacacionales. El número de ciclos iniciados en el año 2014 en este hospital fue de 494, de los que 388 fueron puncionados y 106 cancelados por diversos motivos. Aunque no se conoce la prevalencia real de la exposición a tóxicos (sustancias de abuso y otros tóxicos ambientales) en esta población de parejas estériles de la ciudad de Málaga y sus alrededores, se sospecha que esta prevalencia puede oscilar entre el 2 y el 10% para las sustancias de abuso ilegales, mientras que para el tabaco y el alcohol la prevalencia puede acercarse al 40% del total de mujeres. En un estudio en meconio previo del grupo de García-Algar *et al.*, realizado en la población atendida por el Hospital del Mar en Barcelona, se encontró un 4,7% de positividad a opiáceos, 2,6% a cocaína, 5,3% a cannabis, 45,7% a alcohol y 34% a tabaco. (La prevalencia de la exposición a pesticidas y metales pesados es desconocida) (García-Algar *et al.*, 2008). Por lo tanto, para obtener una población de mujeres estériles consumidoras de sustancias tóxicas o expuestas a las mismas lo suficientemente grande (teniendo en cuenta que los niveles de prevalencia de exposición para una sustancia en concreto serán extremadamente variables) para acometer los objetivos del estudio, se plantea un estudio piloto y se estima que sería preciso incluir alrededor de 250 mujeres para lo que harán falta aproximadamente 12 meses de reclutamiento. En este trabajo de Tesis Doctoral se excluye el consumo de drogas ilegales y fármacos.

- Caso: mujeres consumidoras o expuestas a tóxicos legales y/o contaminantes ambientales: (150) aproximadamente.
- Control: mujeres no consumidoras o expuestas a tóxicos legales y/o contaminantes ambientales: (100) aproximadamente.
- Tamaño total estimado de la muestra: 250 mujeres.
- Tamaño real de la muestra seleccionada: 234 mujeres.
- Tamaño muestral estudiado: N = 205 mujeres.

### 3.1.7. Descripción de la muestra y elaboración de variables

A partir de la información recogida anteriormente se confeccionó una base de datos. La definición y características de cada una de las variables sometidas a estudio se enumeran a continuación.

#### A. Variables independientes:

- $X_1$ . **Edad**: variable cuantitativa discreta que representa la edad de la paciente en años. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: menor y mayor de 35 años.
- $X_2$ . **IMC**: variable cuantitativa continua que representa el índice de masa corporal de la paciente. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: menor y mayor de 23 (mediana).
- $X_3$ . **Étnia**: variable cualitativa categórica que representa el grupo étnico de la paciente. Para su análisis la transformamos en dicotómica: Europea / No europea.
- $X_4$ . **Lugar de residencia**: variable cualitativa categórica que representa el domicilio habitual de la paciente. La dividimos en 5 categorías según el código postal al que pertenecían: Málaga capital / Málaga este / Málaga oeste / Málaga Norte / Fuera de Málaga.
- $X_5$ . **Lugar de trabajo**: variable cualitativa categórica que representa el domicilio laboral de la paciente. La dividimos en 7 categorías según el código postal al que pertenecían y si se encontraban en activo: Paro / Málaga capital / Málaga este / Málaga oeste / Málaga Norte / Fuera de Málaga / Itinerante.
- $X_6$ . **Nivel académico**: variable cualitativa categórica que representa el nivel de instrucción de la paciente. La dividimos en 4 categorías: Sin estudios / Estudios primarios / Estudios secundarios / Estudios universitarios. Para su análisis la dividimos transformamos en dicotómica: Universitaria / No universitaria.
- $X_7$ . **Ocupación laboral**: variable cualitativa categórica que representa el trabajo que desempeña la paciente. La dividimos en 10 categorías: Desempleo / Trabajador por cuenta propia sin asalariados / Trabajador por cuenta propia con 10 o más asalariados /

Trabajador por cuenta propia con menos de 10 asalariados / Gerente de una empresa con 10 o más asalariados / Capataz, supervisor o encargado / Otro asalariado. Para su análisis la transformamos en dicotómica: Activo / No activo.

-  $X_8$ . **Ejercicio físico última semana**: variable cuantitativa discreta agrupada en 9 intervalos que representa el tiempo en horas de ejercicio físico realizado durante la última semana por la paciente: Nada / < 1 hora / 1-2 horas / 2-3 horas / 3-4 horas / 4-5 horas / 5-6 horas / 6-7 horas / > 7 horas . Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: < 4 horas / > 4 horas.

-  $X_9$ . **Tabaco antes del ciclo**: variable cuantitativa discreta agrupada en 6 intervalos que representa el número de cigarrillos diarios fumados por la paciente antes de iniciar el ciclo de FIV: No consumo / 1-5 / 6-10 / 11-15/ 16-20 / >20. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 categorías: No fumadora / Fumadora en alguna ocasión y al no haber cambio significativos de hábitos antes y después del ciclo también agrupamos los 2 intervalos.

-  $X_{10}$ . **Tabaco durante el ciclo**: variable cuantitativa discreta agrupada en 6 intervalos que representa el número de cigarrillos diarios fumados por la paciente durante el ciclo de FIV: No consumo / 1-5 / 6-10 / 11-15/ 16-20 / >20. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 categorías: No fumadora / Fumadora en alguna ocasión y al no haber cambio significativos de hábitos antes y después del ciclo también agrupamos los 2 intervalos.

-  $X_{11}$ . **Tiempo de exposición al humo del tabaco**: variable cuantitativa discreta agrupada en 6 intervalos que representa el tiempo en horas diarias que la paciente se encuentra expuesta al humo del tabaco durante el último año: Nada / <1 HORA / 2-4 horas / 4-8 horas / >8 horas. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: < 4 horas / > 4 horas y al no haber cambio significativo de hábitos sumamos las expuestas menos de 4 horas diarias a las no fumadoras y las expuestas de más de 4 horas diarias a las fumadoras.

-  $X_{12}$ . **Café antes del ciclo**: variable cuantitativa discreta agrupada en 4 intervalos que representa el número de tazas de café diarios consumidos por la paciente

durante el último año antes de iniciar el ciclo de FIV: No consumo / Ocasional / Semanal / Diario. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: Consumo en alguna ocasión / Consumo semanal o diario.

-  $X_{13}$ . ***Café durante del ciclo***: variable cuantitativa discreta agrupada en 4 intervalos que representa el número de tazas de café diarios consumidos por la paciente durante el ciclo de FIV: No consumo / Ocasional / Semanal / Diario. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: Consumo en alguna ocasión / Consumo semanal o diario.

-  $X_{14}$ . ***Alcohol antes del ciclo***: variable cuantitativa discreta agrupada en 4 intervalos que representa la frecuencia diaria de consumo de alcohol por la paciente durante el último año antes del ciclo de FIV: No consumo / Ocasional / Semanal / Diario. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: Consumo en alguna ocasión / Consumo semanal o diario, sin hacer distinción en cuanto a la cantidad y tipo de bebida y agrupando los 2 periodos de antes y después del ciclo al no haberse encontrado diferencias en el cambio de hábitos.

-  $X_{15}$ . ***Alcohol durante el ciclo***: variable cuantitativa discreta agrupada en 4 intervalos que representa la frecuencia diaria de consumo de alcohol por la paciente durante el ciclo de FIV: No consumo / Ocasional / Semanal / Diario. Para su análisis la transformamos en dicotómica con 2 intervalos: Consumo en alguna ocasión / Consumo semanal o diario, sin hacer distinción en cuanto a la cantidad y tipo de bebida y agrupando los 2 periodos de antes y después del ciclo al no haberse encontrado diferencias en el cambio de hábitos.

-  $X_{16}$ . ***Cantidad de alcohol antes del ciclo***: variable cuantitativa discreta que representa la cantidad diaria de consumo de alcohol por la paciente antes el ciclo de FIV en UBE (unidades de bebida estándar) (Tabla 16). Para su análisis la transformamos en dicotómica categórica: Alguna ocasión/ Semanal o diario, sin hacer distinción en cuanto a la cantidad y tipo de bebida y agrupando los 2 periodos de antes y después del ciclo al no haberse encontrado diferencias en el cambio de hábitos.

-  $X_{17}$ . ***Cantidad de alcohol durante el ciclo***: variable cuantitativa discreta que representa la cantidad diaria de consumo de alcohol por la paciente durante el ciclo de FIV



en UBE (Tabla 16). Para su análisis la transformamos en dicotómica categórica: NO/ SÍ, en alguna ocasión, sin hacer distinción en cuanto a la cantidad y tipo de bebida.

- X<sub>18</sub>. **Tipo de bebida**: variable categórica cualitativa que representa el tipo de bebida alcohólica preferentemente consumida por la paciente durante el último año. La dividimos en 5 categorías: cerveza / vino / cerveza y vino / destilados / mezcla de todos. Para su análisis no tuvimos en cuenta el tipo de bebida.

- X<sub>19</sub>. **Tóxicos ambientales**: variable cualitativa categórica que representa la posibilidad de contacto con sustancias conocidas potencialmente tóxicas durante el último año. La dividimos en 9 categorías. Ninguno / Pesticidas / Tintes y pigmentos / Productos químicos fotográficos / Aceites industriales / Aleaciones de metales / Humos de soldar / Cementos. Para su análisis la transformamos en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>20</sub>. **Consumo de agua de beber**: variable cualitativa categórica que representa el tipo de agua consumida para beber por la paciente habitualmente. La dividimos en 5 categorías: Agua del grifo de red / Agua del grifo de pozo / Agua mineral / Ambas: mineral y del grifo / Filtrada de grifo. Para su análisis la sumamos a la variable agua de cocinar, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica: Mineral sola / Indistinta.

- X<sub>21</sub>. **Consumo de agua de cocinar**: variable cualitativa categórica que representa el tipo de agua consumida para cocinar por la paciente habitualmente. La dividimos en 5 categorías: Agua del grifo de red / Agua del grifo de pozo / Agua mineral / Ambas: mineral y del grifo / Filtrada de grifo. Para su análisis la sumamos a la variable agua de beber, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica: Mineral sola / Indistinta.

- X<sub>22</sub>. **Consumo de ensalada**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la cantidad de ensalada consumida por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 veces en semana / > 2 veces en semana.

-  $X_{23}$ . **Consumo de huevos**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de consumo de huevos consumidos por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos:  $< 2$  veces en semana /  $> 2$  veces en semana.

-  $X_{24}$ . **Consumo de carne de cerdo**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de carne de cerdo consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables pollo y vacuno, lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos:  $< 14$  veces al mes /  $> 14$  veces al mes.

-  $X_{25}$ . **Consumo de carne de vacuno**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de carne de vacuno consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables pollo y cerdo, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos:  $< 14$  raciones al mes /  $> 14$  raciones.

-  $X_{26}$ . **Consumo de carne de pollo**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de carne de pollo consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables vacuno y cerdo, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos:  $< 14$  raciones al mes /  $> 14$  raciones.

-  $X_{27}$ . **Consumo de rosada**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de rosada consumidas por la paciente

habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables merluza o similar, sardina y boquerones, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 4 raciones al mes / > raciones al mes.

-  $X_{28}$ . **Consumo de merluza o similar**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de merluza o similar consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables rosada, sardina y boquerones, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 4 raciones al mes / > 4 raciones al mes.

-  $X_{29}$ . **Consumo de boquerones**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de boquerones consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables rosada, sardina y merluza o similar, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 4 raciones / > 4 raciones al mes.

-  $X_{30}$ . **Consumo de sardinas**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de sardinas consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables rosada, boquerones y la merluza o similar, el resultado lo transformamos en cuartiles y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 4 raciones al mes / > 4 raciones al mes.

-  $X_{31}$ . **Consumo de atún**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de atún consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la transformamos en cuartiles, y

tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 raciones a la semana / > 2 raciones a la semana.

-  $X_{32}$ . **Consumo de gambas**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de gambas consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables camarones, mejillones, almejas y cangrejos transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 veces al mes / > 2 veces al mes.

-  $X_{33}$ . **Consumo de camarones**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de camarones consumidos por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables gambas, mejillones, almejas y cangrejos, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 veces al mes / > 2 veces al mes.

-  $X_{34}$ . **Consumo de mejillones**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de mejillones consumidos por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables camarones, gambas, almejas y cangrejos, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 veces al mes / > 2 veces al mes.

-  $X_{35}$ . **Consumo de almejas**: variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de almejas consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables camarones, gambas, mejillones y cangrejos, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica : con 2 intervalos < 2 veces al mes / > 2 veces al mes.

- **X<sub>36</sub>. Consumo de cangrejos:** variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de raciones de cangrejos consumidos por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos a las variables camarones, gambas, mejillones y almejas, el resultado lo transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 veces al / > 2 veces al mes.

- **X<sub>37</sub>. Consumo de latas de conservas:** variable cuantitativa discreta agrupada en 7 intervalos que representa la frecuencia de latas de conservas consumidas por la paciente habitualmente: Casi nunca / 1-3 veces al mes / 1 vez a la semana / 2-4 veces a la semana / 5-6 veces a la semana / 1 vez al día / 2-3 veces al día. Para su análisis la sumamos la transformamos en cuartiles, y tomamos el de menor consumo como referencia para hacerla dicotómica con 2 intervalos: < 2 veces en semana / > 2 veces en semana.

- **X<sub>38</sub>. Pérdidas reproductivas previas:** variable cuantitativa discreta que representa la existencia de pérdidas gestacionales de la paciente antes de realizarse el ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica categórica: NO / SÍ.

- **X<sub>39</sub>. Comorbilidad:** variable cualitativa categórica que representa el antecedente de alguna enfermedad médica de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SI.

- **X<sub>40</sub>. Alergias:** variable cualitativa categórica que representa el antecedente de algún tipo de alergia de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- **X<sub>41</sub>. Cirugía abdominal mayor:** variable cualitativa categórica que representa el antecedente de alguna intervención quirúrgica abdominal mayor por vía laparoscópica y/o laparotómica de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>42</sub>. **Cirugía menor ginecológica**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente de alguna histeroscopia y/o legrado ginecológico de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>43</sub>. **Endometriosis**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de endometriosis peritoneal, ovárica o profunda, en cualquiera de sus estadios, de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>44</sub>. **Anovulación / disovulación**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de la alteración del patrón ovulador de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>45</sub>. **Síndrome de ovario poliquístico (SOP)**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de SOP ecográfico y/o analítico, según los criterios de Rotterdam, de la paciente previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>46</sub>. **Edad avanzada**. Variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de la edad de la paciente igual o superior a 38 años previa al inicio del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>47</sub>. **Baja respuesta y/o reserva ovárica**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de una baja respuesta y/o reserva ovárica de la paciente, con el criterio de haber desarrollado menos de 6 folículos y/o haber recuperado menos de 6 ovocitos, con una dosis suficiente de gonadotropinas durante el ciclo actual de FIV o en un ciclo previo al inicio de éste. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>48</sub>. **Factor tubárico**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de esterilidad de origen tubárico previa al inicio del ciclo de FIV, aunque en sentido estricto debería ser bilateral, aquí hemos considerado también la

unilateral, siendo esta última englobada por la mayoría de los autores en esterilidad de origen desconocido (EOD). Se han dividido en 3 categorías: NO/ Unilateral / Bilateral. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>49</sub>. **Factor uterino**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de esterilidad con patología uterina previa al inicio del ciclo de FIV. La mayoría de los autores la considera como probable causa aislada cuando existe afectación de la cavidad uterina. La hemos dividido en 9 categorías: Ninguna / Leiomioma único o múltiple sin afectación de cavidad uterina / Leiomioma con afectación de cavidad uterina / adenomiosis / Útero arcuato / Útero bicornes / Útero doble / Endometritis crónica / Útero unicornes. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>50</sub>. **Factor masculino**: variable cualitativa categórica que representa el antecedente diagnóstico de esterilidad de origen masculino previa al inicio del ciclo de FIV. Se ha dividido en 7 categorías a modo descriptivo: Normal / Factor masculino leve: rem >3 < 5 millones / Factor masculino moderado: rem > 1 < 3 millones / Factor masculino severo: rem < 1 millón / Semen no capacitado: criptozoospermia / Espermatozoides criopreservados de biopsia o eyaculado / Azoospermia / Vasectomía / Semen de banco (mujer sola). Para su posterior análisis usaremos la variable que distingue factor masculino aislado o esterilidad mixta.

- X<sub>51</sub>. **Esterilidad mixta**: variable cualitativa categórica dicotómica que representa el antecedente diagnóstico de esterilidad con afectación de ambos miembros de la pareja previa al inicio del ciclo de FIV. Opciones: NO / SÍ.

- X<sub>52</sub>. **Esterilidad de origen desconocido**: variable cualitativa categórica dicotómica que representa el antecedente diagnóstico de esterilidad sin causa aparente previa al inicio del ciclo de FIV. Opciones: NO / SÍ.

- X<sub>53</sub>. **Origen de la esterilidad**: variable cualitativa categórica que representa la procedencia de la esterilidad. Se divide en 5 categorías: Femenina / Masculina / Mixta / Origen desconocido / Mujer sin pareja masculina.

-  $X_{54}$ . **FSH basal**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en suero de la paciente de hormona foliculoestimulante en mUI/mL entre el 2º y 5º día del ciclo del último año previo al inicio del ciclo de FIV. Es determinada por quimioluminiscencia en el laboratorio del hospital en dicho periodo. Para su análisis, acorde a la literatura, consideramos un nivel de corte como marcador de reserva folicular ovárica de 12 mUI/mL entre normal y patológico.

-  $X_{55}$ . **LH basal**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en suero de la paciente de hormona luteinizante en mUI/mL entre el 2º y 5º día del ciclo del último año previo al inicio del ciclo de FIV. Es determinada por quimioluminiscencia en el laboratorio del hospital en dicho periodo.

-  $X_{56}$ . **Prolactina basal**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en suero de la paciente de prolactina en ng/mL entre el 2º y 5º día del ciclo del último año previo al inicio del ciclo de FIV. Es determinada por quimioluminiscencia en el laboratorio del hospital en dicho periodo. Consideramos 30 ng/mL como punto de corte de la normalidad.

-  $X_{57}$ . **Estradiol basal**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en suero de la paciente de 17- $\beta$ -Estradiol en pg/mL entre el 2º y 5º día del ciclo del último año previo al inicio del ciclo de FIV. Es determinado por quimioluminiscencia en el laboratorio del hospital en dicho periodo.

-  $X_{58}$ . **Cociente LH/FSH**: variable cuantitativa compuesta que resulta de dividir el nivel de LH por el de FSH. La usamos como marcador de SOP cuando la relación es mayor de 2. Su determinación puede realizarse en otra fase del ciclo.

-  $X_{59}$ . **TSH**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en suero de la paciente de la hormona tiroestimulante en mUI/L durante el último año previo al inicio del ciclo de FIV. La usamos como marcador de disfunción tiroidea y consideramos el punto de corte en 2,5. Se determina por quimioluminiscencia en el laboratorio del hospital.



**B. Variables bidireccionales:** de la  $X_{60}$  a la  $X_{67}$  son variables bidireccionales, ya que las estudiamos como dependientes e independientes. Las describimos a continuación para seguir un orden lógico del proceso de estudio.

-  $X_{60}$ . **As LF**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de arsénico medido por espectrofotometría de masas en una alícuota de líquido folicular de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{61}$ . **Cd LF**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\text{ng/g}$  de cadmio medido por espectrofotometría de masas en una alícuota de líquido folicular de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{62}$ . **Hg LF**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de mercurio medido por espectrofotometría de masas en una alícuota de líquido folicular de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{63}$ . **Pb LF**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de plomo medido por espectrofotometría de masas en una alícuota de líquido folicular de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{64}$ . **As pelo**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de arsénico medido por espectrofotometría de masas en una muestra de pelo de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{65}$ . **Cd pelo**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\text{ng/g}$  de cadmio medido por espectrofotometría de masas en una muestra de pelo de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{66}$ . **Hg pelo**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de mercurio medido por espectrofotometría de masas en una muestra de pelo de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{67}$ . **Pb pelo**: variable cuantitativa continua que representa la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de plomo medido por espectrofotometría de masas en una muestra de pelo de la paciente, obtenido durante la punción ovárica para la recuperación de ovocitos. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

**A.** (continuación de las variables independientes)

-  $X_{68}$ . **Protocolo estimulación**: variable cualitativa categórica que representa el tipo de protocolo que se ha seguido para realizar la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) de la paciente durante la segunda fase del ciclo de FIV. Para su análisis la dividimos en 3 categorías: Largo FSH / Largo FSH + LH / Otros.

-  $X_{69}$ . **Días FSH**: variable cuantitativa discreta que representa el número de días que la paciente estuvo administrándose FSH recombinante (FSH r) hasta la realización de la punción ovárica folicular. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{70}$ . **Dosis FSH**: variable cuantitativa discreta que representa la dosis total de hormona FSH r en UI que se administró la paciente durante todo el ciclo de FIV. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

-  $X_{71}$ . **Ajuste dosis FSH**: variable cualitativa categórica que representa la necesidad de variar la dosis de FSH durante el ciclo de estimulación ovárica. Para su análisis la transformamos en dicotómica.

-  $X_{72}$ . **Días LH**: variable cuantitativa discreta que representa el número de días que la paciente estuvo administrándose LH recombinante (LH r) hasta la realización de la punción ovárica folicular. Para su análisis la transformamos en cuartiles.

- $X_{73}$ . **Dosis LH**: variable cuantitativa discreta que representa la dosis total de hormona LH r en UI que se administró la paciente durante todo el ciclo de FIV. Para su análisis la transformamos en cuartiles.
- $X_{74}$ . **Ajuste dosis LH**: variable cualitativa categórica que representa la necesidad de variar la dosis de LH durante el ciclo de estimulación ovárica. Para su análisis la transformamos en dicotómica.
- $X_{75}$ . **Adyuvantes a la estimulación ovárica**: variable cualitativa categórica que representa la adición de algún fármaco para intentar mejorar la respuesta a la HOC durante el ciclo de FIV. La dividimos en 5 categorías: Ninguno / Inositol / Metformina / Anovulatorios / Estradiol / Cabergolina. Para su análisis la transformamos en dicotómica: NO / SI.
- $X_{76}$ . **Realización ciclos previos**: variable cuantitativa discreta que representa el número de ciclos completados antes de la realización del actual. Para su análisis la transformamos en categórica dicotómica: NO / SÍ.
- $X_{77}$ . **Cancelación ciclos previos**: variable cuantitativa discreta que representa el número de ciclos cancelados antes de la realización del actual. Para su análisis la transformamos en categórica dicotómica: NO / SÍ.

### C. Variables dependientes (resultados de la FIV/ICSI-TE-RN)

(FIV. Fecundación in vitro. ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides. TE: transferencia embrionaria. RN: Recién nacido).

- $X_{78}$ . **Folículos desarrollados**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de folículos desarrollados durante el ciclo de la HOC hasta el último control ecográfico antes de fijar el día de la punción ovárica folicular.
- $X_{79}$ . **Folículos puncionados**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de folículos puncionados el día de la intervención.

-  $X_{80}$ . **Ovocitos totales recuperados**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de cúmulos ovígeros identificados a través del microscopio invertido en el laboratorio de reproducción asistida, obtenidos el día de la punción ovárica folicular.

-  $X_{81}$ . **Ovocitos MII**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos maduros recuperados en estadio meiótico de metafase II, identificados a través del microscopio invertido en el laboratorio de reproducción asistida, tras la decumulación de los mismos, al observarse el primer corpúsculo polar y la ausencia de membrana nuclear ovocitaria. Es un subgrupo de la variable  $X_{80}$ .

-  $X_{82}$ . **Ovocitos MI**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos inmaduros recuperados en estadio de metafase I al no haberse completado la primera división meiótica, identificados en el laboratorio de reproducción asistida, tras la decumulación de los mismos, diferenciándose de los MII por la ausencia del corpúsculo polar. Es un subgrupo de la variable  $X_{80}$ .

-  $X_{83}$ . **Ovocitos VG**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal, identificados en el laboratorio de reproducción asistida, tras la decumulación de los mismos, diferenciándose del resto por la ausencia del corpúsculo polar y la presencia de membrana nuclear. Es un subgrupo de la variable  $X_{80}$ .

-  $X_{84}$ . **Ovocitos atrésicos**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos atrésicos. Se caracterizan por ser ovocitos postmaduros, observándose de entrada un típico color ámbar, confirmándose su diagnóstico tras su decumulación, diferenciándose del resto por presentar un citoplasma retraído y un oolema fragmentado. Es un subgrupo de la variable  $X_{80}$ .

-  $X_{85}$ . **Ovocitos lisados**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos fragmentados. Es un estadio previo a la atresia celular. Al decumularlos de caracterizan por presentar un oolema y zona pelúcida fragmentada con citoplasma retraído. Es un subgrupo de la variable  $X_{80}$ .

- $X_{86}$ . **Cúmulos vacíos**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de cúmulos ovígeros vacíos, o sea, células de la corona radiata organizadas en cúmulos, pero sin ovocito en su interior, habiendo éste completado el fenómeno de atresia celular. Es un subgrupo de la variable  $X_{80}$ .
- $X_{87}$ . **Mala calidad ovocitaria**: variable cualitativa categórica dicotómica que representa una calidad ovocitaria deficiente interpretada por el embriólogo que evalúa el caso. Categorías: NO / SÍ.
- $X_{88}$ . **MII microinyectados**: variable cuantitativa discreta que representa el número de ovocitos MII o maduros que se microinyectan tras su decumulación e incubación oportuna por parte del embriólogo.
- $X_{89}$ . **MI microinyectados**: variable cuantitativa discreta que representa el número de ovocitos en estadio MI de la meiosis que se microinyectan tras su decumulación e incubación oportuna por parte del embriólogo.
- $X_{90}$ . **Ovocitos FIV**: variable cuantitativa discreta que representa el número de ovocitos que se inseminan con FIV clásica.
- $X_{91}$ . **Ovocitos fecundados**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos fecundados provenientes de los MII y MI microinyectados más los de FIV clásica.
- $X_{92}$ . **Ovocitos no fecundados**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos no fecundados provenientes de los MII y MI microinyectados más los de FIV clásica.
- $X_{93}$ . **Fecundación anómala**: variable cuantitativa discreta que indica el número total de ovocitos con fecundación anómala. Para su análisis la transformamos en cualitativa categórica dicotómica que representa la formación de todo cigoto en D+1 en el que no se observen 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares. Categorías: NO / SÍ.

- $X_{94}$ . ***Fecundación FIV***: variable cuantitativa discreta que representa el número total de ovocitos fecundados con FIV clásica.
- $X_{95}$ . ***Embriones calidad A***: variable cuantitativa discreta que representa el número total de embriones generados en el laboratorio de RA que cumpla los criterios de calidad A (< 11% de fragmentación).
- $X_{96}$ . ***Embriones calidad B***: variable cuantitativa discreta que representa el número total de embriones generados en el laboratorio de RA que cumpla los criterios de calidad B (11-25% de fragmentación).
- $X_{97}$ . ***Embriones calidad C***: variable cuantitativa discreta que representa el número total de embriones generados en el laboratorio de RA que cumpla los criterios de calidad C (26-35% de fragmentación).
- $X_{98}$ . ***Embriones calidad D***: variable cuantitativa discreta que representa el número total de embriones generados en el laboratorio de RA que cumpla los criterios de calidad D (> 35% de fragmentación).
- $X_{99}$ . ***Embriones bloqueados***: variable cuantitativa discreta que representa el número total de embriones detenidos en el día anterior a su evaluación. Para su análisis la transformamos en categórica dicotómica: NO / SÍ.
- $X_{100}$ . ***Ritmo de división embrionaria***: variable cualitativa categórica que representa la cinética de división celular el día de su evaluación (ver tabla). Se divide en 3 categorías: NORMAL / LENTO / RÁPIDO. (Hardarson, Hanson, Sjogren, & Lundin, 2001).
- $X_{101}$ . ***Ritmo normal***: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones generados con ritmo de división normal para el día de su evaluación.
- $X_{102}$ . ***Ritmo lento***: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones generados con ritmo de división lento para el día de su evaluación.

- $X_{103}$ . **Ritmo rápido**: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones generados con ritmo de división rápido para el día de su evaluación.
- $X_{104}$ . **Embriones transferidos**: variable cuantitativa discreta que representa el número total de embriones transferidos en fresco.
- $X_{105}$ . **Embriones transferidos A**: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones transferidos en fresco de calidad A. Es un subgrupo de la variable  $X_{104}$ .
- $X_{106}$ . **Embriones transferidos B**: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones transferidos en fresco de calidad B. Es un subgrupo de la variable  $X_{104}$ .
- $X_{107}$ . **Embriones transferidos C**: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones transferidos en fresco de calidad C. Es un subgrupo de la variable  $X_{104}$ .
- $X_{108}$ . **Embriones transferidos D**: variable cuantitativa discreta que representa el número de embriones transferidos en fresco de calidad D. Es un subgrupo de la variable  $X_{104}$ .
- $X_{109}$ . **Células embrión 1**: variable cuantitativa discreta que representa el número de células del primer embrión transferido en fresco.
- $X_{110}$ . **Células embrión 2**: variable cuantitativa discreta que representa el número de células del segundo embrión transferido en fresco.
- $X_{111}$ . **Células embrión 3**: variable cuantitativa discreta que representa el número de células del tercer embrión transferido en fresco.
- $X_{112}$ . **Día transferencia**: variable cuantitativa discreta que representa el día que se realizó la transferencia embrionaria.

- X<sub>113</sub>. **Causa no transferencia**: variable cualitativa categórica que representa el motivo por el que no se realizó la transferencia embrionaria. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ transferencia.

- X<sub>114</sub>. **Vitrificación embriones**: variable cualitativa categórica que representa la criopreservación de embriones derivados del ciclo de FIV actual. Para su análisis la hemos considerado dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>115</sub>. **SHO**: variable cualitativa categórica que representa si existió en la paciente síndrome de hiperestimulación ovárica tras la realización del ciclo de FIV. Para su análisis la hemos considerado dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>116</sub>. **Gestación bioquímica ( $\beta$ HCG)**: variable cuantitativa continua que representa el resultado del análisis de la gonadotropina coriónica por quimioluminiscencia en suero de la mujer a partir de los 15 días postransferencia para determinar la existencia de gestación bioquímica si el nivel es mayor de 50 mUI/mL. Para su análisis la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ gestación bioquímica.

- X<sub>117</sub>. **Gestación clínica**: variable cualitativa categórica que representa la existencia de gestación en la paciente comprobándose por ecografía transvaginal a los 14 días aproximadamente de la realización de la  $\beta$ HCG. Para su análisis la hemos categorizado en NO / SÍ.

- X<sub>118</sub>. **Número de sacos**: variable cuantitativa discreta que representa el número de sacos gestacionales detectados por ecografía en la gestante.

- X<sub>119</sub>. **Gestación evolutiva**: variable cualitativa categórica que representa la existencia de gestación viable al detectarse latido cardíaco por ecografía y Doppler pulsado y color. Para su análisis la hemos categorizado dicotómica: NO / SÍ.

- X<sub>120</sub>. **Aborto**: variable cualitativa categórica que representa la pérdida de la gestación intrauterina lograda con el ciclo de FIV. Para su análisis la hemos categorizado en dicotómica: NO / SÍ.



- $X_{121}$ . **Patología obstétrica**: variable cualitativa categórica que representa la existencia de alguna patología obstétrica de la paciente en el transcurso de su gestación. Para su estudio la hemos transformado en dicotómica: NO / SÍ.
- $X_{122}$ . **Vía del parto**: variable cualitativa categórica que representa la vía del parto. Para su análisis la transformamos en dicotómica: Vaginal / Cesárea.
- $X_{123}$ . **Prematuridad**: variable cualitativa categórica que representa el nacimiento del feto antes de las 37 semanas cumplidas de gestación. Para su análisis la hemos considerado como dicotómica: NO / SÍ.
- $X_{124}$ . **Recién nacido de bajo peso**: variable cualitativa categórica que representa el nacimiento de un feto por debajo de los 2500 g. Para su análisis la hemos considerado como dicotómica: NO / SÍ.
- $X_{125}$ . **Parto gemelar**: variable cualitativa categórica que representa la existencia de parto gemelar. Para su análisis la hemos considerado dicotómica: NO / SÍ.
- $X_{126}$ . **Estado del recién nacido**: variable cualitativa categórica que representa la existencia de cualquier patología detectada en el recién nacido. Para su análisis la hemos considerado dicotómica: SI / NO.

#### **D. Indicadores de resultados**

Hay que tener en cuenta las variables descritas a continuación para construir variables compuestas y poder analizar y comparar los datos, tanto con esta muestra como con otros estudios.

- Tipo de respuesta: Normoovuladora. Baja respuesta. Alta respuesta.
- Total folículos puncionados (denominador).
- Total ovocitos recuperados (numerador y denominador).
- Total embriones generados (denominador).
- Total embriones generados A, B, C Y D. (numerador y denominador).

➤ **Indicadores de resultados de ovocitos**

- Tasa total de ovocitos recuperados =  $\text{n}^\circ \text{ ovocitos totales} / \text{folículos puncionados}$ .
- Tasa de ovocitos (MII) maduros recuperados =  $\text{n}^\circ \text{ ovocitos MII recuperados} / \text{n}^\circ \text{ folículos puncionados}$ .
- Tasa de inmadurez ovocitaria =  $\text{n}^\circ \text{ de ovocitos MI+VG+Atrésicos+CV+lisado} / \text{n}^\circ \text{ foliculos puncionados}$ .
- Ratio de madurez ovocitaria =  $\text{n}^\circ \text{ de ovocitos MII} / \text{MI+VG+Atrésicos+CV+lisados}$ .
- A la inversa es la tasa de inmadurez ovocitaria.

➤ **Indicadores de resultados de embriones**

- Tasa bruta de fecundación =  $\text{n}^\circ \text{ embriones totales} / \text{n}^\circ \text{ ovocitos MII+MI+FIV clásica}$ .
- Tasa de fecundación ICSI =  $\text{n}^\circ \text{ embriones totales} / \text{n}^\circ \text{ ovocitos MII+MI microinyectados}$ .
- Tasa de fecundación ICSI de MII =  $\text{n}^\circ \text{ de embriones totales} / \text{n}^\circ \text{ ovocitos MII microinyectados}$ .
- Tasa de fecundación FIV =  $\text{n}^\circ \text{ embriones totales} / \text{n}^\circ \text{ de ovocitos inseminados con FIV clásica}$ .
- Tasa bruta de fecundación de embriones óptimos =  $\text{n}^\circ \text{ de embriones A+B} / \text{MII+MI+FIV clásica}$ .
- Tasa de fecundación de embriones óptimos de MII =  $\text{A+B} / \text{MII}$ .
- Tasa bruta de fecundación de embriones subóptimos =  $\text{C+D} / \text{MII+MI+FIV clásica}$ .
- Tasa de fecundación de embriones subóptimos de MII =  $\text{C+D} / \text{MII}$ .
- Tasa bruta de ovocitos no fecundados =  $\text{MII+MI+Ovocitos de FIV no fecundados} / \text{MII+MI microinyectados +ovocitos de FIV clásica inseminados}$ .

- Tasa de MII no fecundados =  $\text{MII no fecundados} / \text{MII microinyectados}$
- Tasa de fecundación anómala de MII =  $\text{nº embriones distintos a 2 pronúcleos} / \text{nº ovocitos MII microinyectados}$ .
- Ratio calidad embrionaria =  $\text{embriones A+B} / \text{embriones C+D}$ .
- Tasa bruta de embriones bloqueados:  $\text{nº total de embriones bloqueados en D+1+2+3} / \text{nº total ovocitos MI+MI+FIV inseminados}$ .
- Tasa de embriones bloqueados de MII =  $\text{nº embriones bloqueados en D+1+2+3} / \text{nº total de ovocitos MII microinyectados}$ .
- Tasa bruta de embriones con velocidad de división normal =  $\text{nº de embriones con velocidad normal} / \text{MII+MI+ Ovocitos FIV}$ .
- Tasa bruta de embriones con velocidad lenta =  $\text{embriones lentos} / \text{MII+MI+ Ovocitos FIV}$ .
- Tasa bruta de embriones rápidos =  $\text{embriones rápidos} / \text{MII+MI+ ovocitos FIV}$ .
- Tasa de velocidad normal de embriones de MII =  $\text{nº embriones velocidad normal} / \text{nº MII microinyectados}$ .
- Tasa de velocidad lenta de embriones de MII =  $\text{nº embriones lentos} / \text{nº MII microinyectados}$ .
- Tasa de velocidad rápida =  $\text{nº embriones rápidos} / \text{nº MII microinyectados}$ .
- Ratio embriones lentos =  $\text{embriones lentos} / \text{normales + rápidos}$ .
- Ratio embriones rápidos =  $\text{embriones rápidos} / \text{normales + lentos}$ .

➤ **Indicadores de resultado de transferencia**

- Media de células de embriones transferidos.
- Proporción de embriones transferidos de calidad óptima =  $\text{n}^\circ \text{ embriones transferidos A+B} / \text{A+B+C+D}$ .
- Proporción embriones transferidos calidad subóptima =  $\text{C+D} / \text{A+B+C+D}$ .

➤ **Indicadores de resultados de embarazos**

Se puede hacer por ciclo iniciado. por punción o por paciente que en este caso coincide por punción porque solo se recluta a una paciente por caso o por transferencia que es el que vamos a realizar.

- Tasa de embarazo bioquímico por transferencia =  $\text{n}^\circ \beta\text{HCG} > 50 \text{ mUI/mL} / \text{n}^\circ \text{ detransferencias}$ .
- Tasa de embarazo clínico por transferencia =  $\text{n}^\circ \text{ de casos con al menos 1 saco} / \text{n}^\circ \text{ transferencias}$ .
- Tasa de aborto por transferencia =  $\text{n}^\circ \text{ de abortos} / \text{n}^\circ \text{ transferencias}$ .
- Tasa de abortos por gestación bioquímica =  $\text{n}^\circ \text{ abortos} / \text{n}^\circ \text{ gestaciones bioquímicas}$ .
- Tasa de recién nacidos vivos por transferencia =  $\text{n}^\circ \text{ de recién nacidos vivos} / \text{n}^\circ \text{ de transferencias}$ .
- Tasa de gemelares por transferencia =  $\text{n}^\circ \text{ recién nacidos gemelos} / \text{n}^\circ \text{ transferencias}$ .
- Tasa de RN bajo peso =  $\text{n}^\circ \text{ RN} < 2500 \text{ g} / \text{n}^\circ \text{ de partos}$ .
- Tasa de prematuridad ( $< 37$  semanas) =  $\text{n}^\circ \text{ RN} < 37 \text{ semanas} / \text{n}^\circ \text{ de partos}$ .

## **3.2. INSTRUMENTOS**

### **3.2.1. Historia clínica, cuestionario y consentimiento**

#### **A. Historia clínica de la paciente y su pareja**

Se extraen datos la anamnesis, de filiación, antecedentes médico y quirúrgicos relevantes, alergias conocidas, antecedentes ginecológicos y obstétricos, tiempo de evolución de la esterilidad y/o infertilidad primaria o secundaria, TRA previos. Exploración física genital y abdominal para determinar si existen alteraciones a nivel de genitales externos, la vagina, el cérvix, el útero o los anejos. Analíticas realizadas a ambos: grupo sanguíneo y Rh, serología de hepatitis B y C, HIV, CMV y lúes; para ella, serología de rubeola, hemograma completo, panel básico de coagulación, eje o ciclo gonadal hormonal basal con FSH, LH, PRL (prolactina) y estradiol entre el 2º y 5º día y de segunda fase, si procede, progesterona a partir del día 21-22 (en 2014 no disponíamos en nuestro hospital actualmente de la hormona antimülleriana (AMH)); para él, seminograma y capacitación espermática (REM). Pruebas complementarias de imagen: ecografía transvaginal siempre, histerosalpingografía (HSG), resonancia magnética nuclear (RMN) o tomografía computadorizada (TAC) pélvicas si han sido necesarias). Citología cérvico-vaginal del último año siempre e hibridación y tipaje de HPV (virus del papiloma humano) si se estima necesario. Estudios genéticos: para él, cariotipo y determinación de microdelecciones del cromosoma Y en sangre periférica si existe oligoastenozoospermia severa, teratozoospermia o azoospermia (se solicita mutaciones del gen FQ si se sospecha azoospermia obstructiva no yatrógena) (no disponemos actualmente de estudio genético del espermatozoide como fragmentación de ADN o FISH de aneuploidías); para ella, en caso de fallo ovárico precoz (FOP) se solicita cariotipo y estudio del cromosoma X frágil; para ambos mutaciones del gen de la fibrosis quística. Informes médicos, si se estima, de especialistas de otras áreas como hematología si se sospecha en ella trombofilia o síndrome antifosfolípido (SAF) o alguna otra alteración hematológica, psiquiatría, medicina interna, endocrinología, aparato digestivo si se sospecha enfermedad celíaca o cualquier otra patología relacionada con la infertilidad, cirugía general, ginecología quirúrgica, etc. y para él, informe de urología, con diagnóstico y biopsia testicular asincrónica en los casos que se pueda criopreservar muestra de espermatozoides testiculares para ICSI (microinyección intracitoplasmática de espermatozoides).

## B. Cuestionario

Se compone de datos demográficos, socioeconómicos, nivel de instrucción, actividad física, consumo y exposición a tabaco, alcohol, cafeína, otros tóxicos ambientales y alimentación (ver apéndice). La encuesta y el consentimiento informado se entregan en consulta durante la visita para iniciar el ciclo de FIV.

## C. Documentos de consentimiento informado.

Se entregan 2 tipos de consentimiento informado, uno para la recogida de las muestras biológicas y otro para la criopreservación y estudio de las mismas (ver apéndice). Además de los consentimientos oficiales de la TRA en curso debidamente cumplimentados y firmados.

### 3.2.2 Fármacos utilizados

Debido a la internalización en la farmacia hospitalaria de las gonadotropinas y al concierto con el laboratorio suministrador, solo se utilizaron gonadotropinas recombinantes del laboratorio Merck-Serono® para la hiperestimulación ovárica controlada (HEOC). Los tipos utilizados fueron:

- **FSH recombinante** (FSH-r) o folitropina alfa con nombre comercial Gonal f®, disponible en presentaciones de ampollas de 1200 UI (77 µg.) y 75 UI (5,5 µg.) en polvo liofilizado para reconstituir al inicio del tratamiento con 1,75 y 0,5 mL. de disolvente respectivamente. Existen también en plumas precargadas reconstituidas en solución de 900, 450 y 300 UI., o lo que es lo mismo 66 µg/1,5 mL., 33 µg./0,75 mL. y 22 µg./0,5 mL. respectivamente. Todas se administran por vía subcutánea (SC). (UI: unidades internacionales). Existen otras gonadotropinas recombinantes como la folitropina beta y una forma depot como la coriofolitropina alfa de 150 y 100 µg. que tampoco utilizamos. Las gonadotropinas urinarias, con o sin acción LH, tampoco las utilizamos en el periodo de estudio. Por último, la nueva generación de fármacos biosimilares a la FSH, al no disponer de ellos por las razones antes expuestas, no fueron utilizados.

- **LH recombinante** (LH-r) o lutropina alfa con nombre comercial Luveris®, disponible en presentaciones de ampollas de 75 UI (3 µg.) en polvo liofilizado para reconstituir al inicio del tratamiento con 1 mL de disolvente. Se administra por vía SC.

- **FSH+LH recombinante** (FSH-LH-r) con nombre comercial Pergoveris® en presentaciones de ampollas de FSH-r 150 UI (11 µg.) más LH-r 75 UI (3 µg.) en polvo liofilizado para reconstituir al inicio del tratamiento con 1 ml. de disolvente. Se administra por vía SC.

- **hCG recombinante** (hCG-r) o gonadotropina coriónica humana o coriogonadotropina alfa con nombre comercial Ovitrelle® en presentación de pluma precargada reconstituida en solución de 250 µg / 0,5 mL. equivalente a 6500 UI. Se administra por vía SC.

- **Análogos de la GnRH** (hormona liberadora de gonadotropinas). Se utilizó fundamentalmente la nafarelina acetato con nombre comercial Synarel® en presentación de frasco de 8 mL para administración intranasal con 2 mg/mL de principio activo. Cada pulverización de 1 µL de solución acuosa libera 200 µg de nafarelina. A dosis de 400 µg diarios el frasco dura 1 mes. Existen otros análogos de la GnRH como son la leuprorelina (Procrin®) en presentación de solución inyectable vía SC. de 2,8 mL a la concentración de 1 mg / 0,2 mL que fue utilizado excepcionalmente en pacientes alérgicas a la nafarelina o a alguno de sus excipientes o que simplemente no lo toleraban. Otro análogo disponible en el mercado es la triptorelina, pero no lo utilizamos.

- **Antagonistas de la GnRH.** Existen 2 preparados disponibles cuyos principios activos son el cetrorelix 0,25 mg (Cetrotide®) y el ganirelix 0,25 mg (Orgalutran®). El primero se presenta como solución de 0,5 mL en jeringa precargada. y el segundo se presenta en ampollas de 0,25 mg / 1 mL y 3mg / 3 mL de polvo liofilizado para reconstituir. Ambos para administración vía SC.

- **Otros fármacos** considerados adyuvantes para la FIV son la progesterona natural micronizada presentada en cápsulas blandas de 200 y 100 mg (Progeffik® y Utrogestan®) utilizados de apoyo de fase lútea. Se utiliza fundamentalmente por vía transvaginal, aunque también se puede usar por vía oral teniendo ésta menor absorción y mayores efectos adversos.

En determinadas ocasiones es preciso usar anovulatorios por vía oral o transvaginal cuando la paciente presenta ciclos irregulares o amenorreas prolongadas para así controlar el ciclo y poder programar la FIV por razones de agenda y disponibilidad de recursos.

Por último, a veces se usan adyuvantes como el inositol y la metformina por vía oral y a dosis variables para intentar mejorar el desarrollo folicular y la ovulación en pacientes con SOP. En ocasiones indicamos algún preparado con antioxidantes para intentar mejorar la calidad ovocitaria en pacientes con baja respuesta o baja reserva ovárica con resultados discutibles según la literatura consultada (Ahelik *et al.*, 2015; Dehghani-Mohammadabadi *et al.*, 2014).

### **3.3.3. Dotación equipamiento, materiales y reactivos.**

#### **➤ Ecógrafos.**

Se utilizaron 2 ecógrafos Aloka® 3500 equipados con sonda vaginal y abdominal multifrecuencia y Doppler pulsado y color con videoprinter Toshiba® ubicados en las 2 consultas de la URH del HRU de Málaga.

#### **➤ Laboratorio de Reproducción Asistida.**

##### **a. Dotación de laboratorio**

- Campana de flujo laminar termostatzada K Systems® IVF Work Station. L 126 con 2 puestos de trabajo.
- Campana de flujo laminar Gelair®.
- Campana de flujo laminar Telstar® micro V.
- Microscopio lupa Nikon® SM 2800.
- Microscopio lupa Lan optics®.
- Microscopio Olympus® CH.
- Microscopio invertido Nikon ®.
- 2 microscopios invertidos Nikon® TE 2000-S con platinas calrfactadas Tokay®.
- 2 micromanipuladores Narishige®.
- Cámara de Neubauer para recuento de espermatozoides.
- Cámara de video Sony®.
- Incubador CO<sub>2</sub> SANYO® MCO-BAIC.
- Incubador CO<sub>2</sub> HERACELL® 150 i.
- Bombona de CO<sub>2</sub>.
- Estufa Heraeus Electronic ®D 6450.



- Contenedor de Nitrógeno líquido GT® 35.
- Contenedor de Nitrógeno líquido MVE Millennium ®2000 SC 20.
- Contenedor de nitrógeno líquido B 2016.
- Bombona de nitrógeno líquido.
- Criocongelador de embriones y semen .
- Centrifugadora de cabezal basculante.
- Frigorífico Edesa® 4. \*
- Monitor televisión Sanyo 25.”

b. Material fungible

- Placas Petri estériles y embriotestada de 10 cm.
- Placas 1008 y 1006.
- Tubos Falcon Cónicos de 15 ml.
- Tubos Falcon base redondeada con tapón de dos posiciones.
- Placas Nunc de 4 pocillos.
- Pipetas automaticas Labopipete® de distintos volúmenes regulables entre 2 µL y 2 mL.
- Pipetas Pasteur de cristal estériles.
- Pipetas de plástico estériles 3.5 mL Sarstedt® AG & Co
- Puntas de pipeta estériles acordes con los volúmenes.
- Micropipeta Holding Wallace WHP®-90-20.
- Micropipeta ICSI injection WIC®-50V-20.
- Catéteres de transferencia embrionaria transvaginal Labotect®13365.
- Catéteres para inseminación artificial Gynetics®.
- Jeringas de 1 mL BD plastipak®.
- Cámaras de recuento Neubauer®.
- Pajuelas para criopreservación Origio Cryoleaf®.
- Portas y cubreobjetos, agujas s.c. y hojas de bisturí para fragmentación de biopsia testicular.
- Contenedores de material punzante de desecho.

c. Medios de cultivo, soporte y manipulación de gametos y embriones

- G-MOPS plus® de Vitrolife®. Medio tamponado utilizado para punción folicular, decumulación de ovocitos y microinyección espermática.
- G-IVF plus®. de Vitrolife®. Medio de conservación de los ovocitos desde que se recuperan hasta que se les practica la ICSI. Se usa también para la FIV clásica y para la capacitación espermática por el método swim up.
- G1 plus® de Vitrolife®. Medio utilizado para cultivo embrionario hasta D+3 (3º día desde la FIV/ICSI).
- G2 plus® de Vitrolife®. Medio que se utiliza para transferencia embrionaria y cultivo largo hasta D+5 (blastocisto).
- OVOIL® de Vitrolife®. Aceite de parafina para soporte del ovocito en la ICSI.
- HYASE®. Hialuronidasa utilizada para decumular ovocitos.
- PVP. Polivinilpirrolidona utilizada para practicar la ICSI.
- Pure sperm® de Nidacom®. Medio utilizado para el método de gradientes de capacitación espermática.

### ➤ **Quirófano de Reproducción Asistida.**

#### a. Dotación de quirófano

- Mesa de quirófano con perneras para posición ginecológica.
- Lámpara satélite de quirófano de 2 brazos con reflectores de 30.000 lux.
- Pulsioxímetro de mesa Philips®.
- Desfibrilador DESA.
- Ecógrafo con sonda vaginal Aloka® Prosound-6.
- Guías de punción adaptables al ecógrafo suministradas por el fabricante.
- Videoprinter Toshiba®.
- Aspirador de ovocitos Rocket Duo-Vac suction pump de Rocketmedical®.
- Aguja de punción Origio® 17 G de 33 cm.
- Aguja de punción espinal G18 para anestesia paracervical.
- Recipiente tópico para lavado.
- Fundas de sonda vaginal de ecógrafo desechables sin polvo con y sin látex.
- Guantes quirúrgicos de varios tamaños estériles sin polvo con y sin látex.
- Espécules de Cusco y Graeve, pinzas de disección de Pean y de Magil, pinzas de Foerster, pinzas de Pozzi e histerómetros.

- Set de paños estériles desechables de parto y mesa quirúrgica.
- Portasueros.
- Sonda vesical desechable.
- Juego de dilatadores blandos.

➤ **Muestras biológicas.**

- Muestra de *cabello* de la paciente, para detectar la presencia de sustancias tóxicas y sus metabolitos. Una muestra única recogida durante la visita para realizar la punción ovárica folicular.

- Muestra de *líquido folicular*, para detectar la presencia de sustancias tóxicas y sus metabolitos. Una muestra única recogida durante la visita para realizar la punción folicular.

➤ **Laboratorio de análisis clínicos del Hospital.**

Todas las pacientes atendidas en la URH del HRU de Málaga requieren control analítico interno, donde se determina un hemograma, un estudio básico de la coagulación, la serología de hepatitis y HIV, y las hormonas FSH, estradiol, prolactina,

### 3.3. PROCEDIMIENTOS

#### 3.3.1. Recogida de datos.

Los datos procedentes de la Historia Clínica de la paciente y de su pareja, así como los del cuestionario de exposición, del laboratorio de análisis clínico, del libro de registro del laboratorio de RA, del laboratorio de espectrofotometría del Scai y del registro de partos del hospital se introdujeron en una base de datos del programa estadístico SPSS, versión 23.0 (SPSS Inc., Chicago IL®) para su posterior análisis.

### 3.3.2. Descripción de los procedimientos seguidos: estimulación, punción, transferencia, manejo de las muestras y análisis de laboratorio.

#### ➤ Protocolos de Hiperestimulación ovárica controlada

Una vez realizado el diagnóstico de esterilidad de la pareja e indicado el tratamiento de reproducción asistida (TRA) la paciente pasa al programa de FIV-TE. El proceso en la fase clínica consiste en realizar una hiperestimulación ovárica controlada (HEOC), para lo cual disponemos de distintos protocolos. De entrada, las pacientes se clasifican en función de la edad, el IMC, el origen de la esterilidad, el tipo menstrual, la reserva ovárica tanto ecográfica como hormonal y la respuesta en ciclos anteriores. Una vez evaluados estos factores nos podemos encontrar con 3 clases de pacientes:

- *Normorrespondedora*: paciente que desarrolla entre 6 y 18 folículos tras una HEOC con dosis estándar de 225 UI de FSH diarias.
- *Baja respondedora*: paciente que desarrolla menos de 6 folículos tras una HEOC con dosis estándar o alta (límite eficaz 450 UI) a pesar de asociar LH.
- *Hiperrespondedora*: paciente que desarrolla más de 18 folículos tras una HEOC con dosis estándar o baja de FSH.

Si la paciente tiene ciclos menstruales irregulares se le prescribe un anticonceptivo hormonal monofásico con el fin de poder programar el ciclo de FIV al precisarse una referencia menstrual.

El *análogo o el antagonista* de la GnRH se utiliza en FIV para evitar el pico prematuro de LH endógena que desencadenaría la ovulación de forma descontrolada. Según el momento de inicio de la supresión hipofisaria y el tipo de preparado existen varios protocolos, como son: el largo, en el que se inicia el análogo de la GnRH desde mitad de fase lútea del ciclo anterior, bajando generalmente la dosis a la mitad el día del inicio de la estimulación; el corto con análogos, en el que se inicia su administración el primer día del ciclo menstrual, bajando generalmente la dosis a la mitad desde el tercer día; el corto con antagonistas de la GnRH, que a su vez puede ser flexible, si se administra a partir de la existencia de algún folículo seleccionado igual o mayor de 14 mm de diámetro, o fijo, si se administra a dosis única el 6º día de la HEOC.

Los protocolos de de HEOC se clasifican fundamentalmente en 2 tipos, según la fase del ciclo menstrual en la que se comienza con la administración del análogo o el antagonista de la GnRH, y se denominan largo y corto:

a) **Protocolo largo:** es el que se utilizó durante el presente estudio casi con exclusividad dada la ventaja de que permite una fácil programación con la idea de evitar los fines de semana y días festivos. El análogo utilizado casi con exclusividad en este periodo fue el acetato de nafarelina por vía intranasal a dosis de 600 µg diarios repartidos en una inhalación por la mañana y dos inhalaciones por la noche o viceversa. A su vez, el protocolo largo, según el tipo de gonadotropina utilizada puede ser simple, con FSH, o combinado asociando gonadotropinas con acción LH. En nuestro caso se utilizó exclusivamente FSH-r y LH-r. La desensibilización hipofisaria se inicia administrando la nafarelina en mitad de fase lútea del ciclo anterior con el fin de evitar el efecto “flare-up” del análogo, lográndose generalmente a los 14 días del inicio de su administración (Fig. 34).

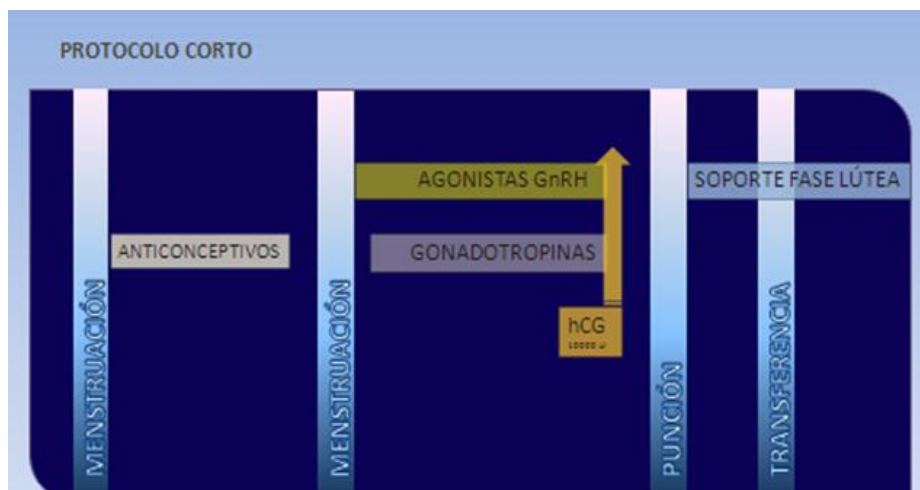


Figura 34. Protocolo largo con análogo de GnRH.

b) **Protocolo corto:** la diferencia con el protocolo largo, como sabemos, radica en el inicio de la supresión hipofisaria.

El protocolo corto con análogos tiene como ventajas el efecto “flare-up” que se puede utilizar para intentar seleccionar más folículos en la baja respondedora, también requiere menos dosis y días de estimulación. Como inconvenientes tiene que es menos controlable para la programación de la PAOF por tener que iniciarse con la menstruación,

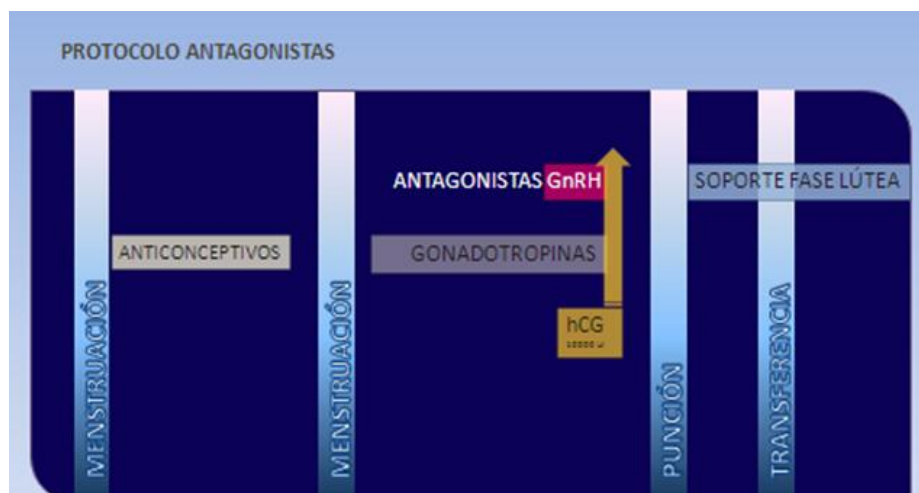
con lo que su utilidad es limitada en un centro público con el plan de trabajo de la URH del HRU de Málaga, además, el desarrollo folicular suele ser más asincrónico y existe mayor riesgo de luteinización. Las dosis de nafarelina generalmente empleadas son de 600 µg diarios repartidas en 1 inhalación por la mañana y 2 inhalaciones por la noche los 3 primeros días, continuando con la mitad de dosis el resto de los días (Fig. 35).



**Figura 35.** Protocolo corto con análogo de GnRH.

El protocolo corto flexible con antagonistas de la GnRH, utilizado en alguna ocasión, adicionalmente posee la ventaja de que se puede desencadenar la ovulación generalmente con 0,2 mg de triptorelina o 0,4 mg de leuprorelina, si la respuesta ha sido excesiva, para intentar así evitar el riesgo de SHO, con el inconveniente de que al tener efectos deletéreos sobre el endometrio, precisa de la vitrificación de embriones al no estar indicada la transferencia en fresco por la disminución de las tasas de gestación según los estudios que avalan esta forma de proceder. Los antagonistas utilizados a dosis diaria son el ganirelix y el cetrorelix de 0,25 mg (Fig. 36).

El protocolo corto fijo a dosis única de 3 mg de cetrorelix no se utiliza en nuestro medio.



**Figura 36.** Protocolo largo con análogo de GnRH.

Antes de comenzar con la **hiperestimulación ovárica controlada (HEOC)**, la paciente ha estado una media de 14 días administrándose la nafarelina en el protocolo largo y es citada en consulta para comprobar el reposo ovárico por ecografía, lo cual se cumple si todos los folículos observados son menores de 10 mm y la línea endometrial es menor de 6 mm, además la paciente ha debido pasar o tener la menstruación antes de pasar a la fase de estímulo. En el protocolo corto la paciente acude al control con la menstruación o con la medicación iniciada si coincide ésta con un fin de semana o día festivo. En esta consulta se realiza también el recuento de folículos antrales (RFA) que es fundamental antes de pasar a la fase de HEOC. Según sea el perfil de cada paciente, se selecciona la dosis de inicio de gonadotropina y la necesidad de combinación de las mismas, así, la paciente normorrespondedora se inicia con dosis estándar de 225 UI diarias de FSH-r; la baja respondedora se inicia con dosis de FSH-r de entre 300 y 450 UI diarias, asociando si precisa LH-r a dosis de entre 75 y 225 UI diarias; y, por último, la hiperrespondedora se inicia con FSH-r oscilando la dosis entre 50 y 150 UI diarias. La HEOC se inicia generalmente al siguiente día del control de supresión hipofisaria. En ocasiones se utilizan fármacos para intentar mejorar la respuesta a las gonadotropinas como puede ser la metformina y el mioinositol en el SOP o el citrato de clomifeno, el letrozol y la testosterona transdérmica en la baja respuesta.

La paciente es citada a los 7 días con 5-6 días de estimulación para controlar el tipo de respuesta y ajustar la dosis de gonadotropinas. Si la respuesta es la esperada se mantiene la dosis de inicio, pero si no es así, se disminuye hasta un 25-75% o se aumenta un 25-300% durante los 3 controles sucesivos que se realizan cada 48 horas. En los casos de baja respuesta inesperada, además de aumentar la dosis de FSH-r, también se suele añadir LH-r a dosis de 75-225 UI diarias. En los casos de alta respuesta inesperada por encima de 18-20 folículos desarrollados se suele cancelar el ciclo por riesgo de SHO.

En el tercer control, si la respuesta ha sido adecuada en número y tamaño de los folículos desarrollados (alguno mayor de 17 mm) se fija el *desencadenamiento de la ovulación con* hCG-r a dosis única de 250 µg 35-37 horas antes de la punción-aspiración ovárica folicular (PAOF). Así pues, pasan a la siguiente fase las pacientes que hayan desarrollado 4-20 folículos, el resto son canceladas. Si no hay ningún folículo que alcance el tamaño adecuado como puede ocurrir en la baja respondedora o en el SOP, se mantiene la HEOC con ajuste de dosis hasta el siguiente control a los 3 días, pasado el fin de semana, hasta alcanzar el objetivo de algún folículo mayor de 17 mm. Si la repuesta ha sido alta se puede desencadenar con un análogo de la GnRH como dijimos anteriormente con la salvedad de que no se podrá realizar la transferencia embrionaria en fresco.

#### ➤ **Quirófano de RA. Punción ovárica folicular**

El día previsto, la paciente ingresa por Hospital de Día, en ayunas desde la noche anterior, donde se le canaliza una vía venosa periférica y se le administra 10 mg de diacepam sublingual.

Posteriormente es trasladada al quirófano de RA donde se monitoriza la tensión arterial y la pulsioximetría en la mesa quirúrgica. Se prepara la mesa de instrumental estéril con espéculo, aguja de punción ovárica, aguja de anestesia local, guía de punción, pinza de disección larga, recipiente tópico con suero fisiológico para lavar, jeringa de 20 mL, paquete de gasas, funda de sonda de ecógrafo, sonda vesical de un solo uso y guantes estériles. Se coloca a la paciente en posición ginecológica. Se prepara campo quirúrgico en condiciones de asepsia y antisepsia, se realiza sondaje vesical no permanente para evitar lesiones a este nivel. Se expone el cérvix y el fondo de saco vaginal. Se lava la vagina con suero fisiológico, evitando el uso de antisépticos convencionales por su potencial toxicidad



sobre los ovocitos. Se administra anestesia local paracervical con Lidocaína al 2%, inyectando 10 mL en cada lado a una profundidad de unos 3 cm.

Acto seguido, se avisa al personal de laboratorio para que traiga la gradilla con los tubos Falcon debidamente calefactados y con 0,5 mL de G-MOPS plus® cada uno. Con la aguja de punción conectada al aspirador de ovocitos Rocket Duo-Vac suction pump de Rocketmedical®, se procede al lavado del sistema conectando un tubo Falcon vacío al tapón colector intermedio que lleva el sistema de la aguja, desechándose este primer tubo.

Por fin, se procede a la punción-aspiración ovárica folicular transvaginal ecoguiada propiamente dicha por el ginecólogo ayudado por la enfermera. El primer folículo aspirado se recoge en un tubo Falcon sin medio, ya que es éste el que utilizaremos posteriormente para el estudio de metales pesados. El resto de folículos se van puncionando y aspirando sucesivamente hasta finalizar el procedimiento. Lo último es desinfectar la vagina con agua oxigenada y comprobar la hemostasia.

Mientras tanto, el embriólogo va recibiendo los tubos con el líquido folicular en su laboratorio y los va depositando en una placa de Petri en la campana de flujo laminar, equipada con lupa y microscopio invertido y temperatura controlada a 37°C, para ir localizando, recuperando y depositando los cúmulos ovígeros en las placas Nunc para luego trasladarlos al incubador hasta su procesamiento. A su vez, recupera el líquido folicular del tubo sin medio en una jeringa de 5 mL, la sella con tapón de silicona, la introduce en un sobre con la identificación de la paciente y la guarda en la nevera a 4°C hasta su posterior retirada en la misma mañana por el personal del Biobanco que procesará acto seguido para su criopreservación como luego describiremos.

La enfermera del quirófano de RA, antes o después de la PAOF, le corta a la paciente con tijeras un mechón de pelo de aproximadamente 1 cm de espesor de la región occipital, lo fija en una hoja de papel con pinzas y lo introduce en un sobre con la identificación de la paciente hasta su posterior retirada en la misma mañana por el personal de Biobanco para su preservación como luego describiremos.



**Figura 37.** Aspirador de ovocitos y aguja de punción ovárica.

➤ **Fase de laboratorio de reproducción asistida**

En el laboratorio de RA se llevan a cabo una serie de procedimientos que describiremos a continuación.

**a) Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)**

La inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito que previamente se ha decumulado<sup>1</sup>. Se utiliza en los casos en que no se puede realizar la FIV convencional. Las indicaciones más relevantes son:

- Mala recuperación del semen.
- Factor masculino grave (REM < 1 millón/mL).
- Infertilidad de causa inmunitaria.
- Sémenes valiosos.
- Imposibilidad de recoger la muestra, biopsia de testículo, aspiración

de epidídimo.

- Fallo de fecundación en FIV.
- Fallo de gestación en inseminación artificial.
- Diagnóstico preimplantacional (DPI).
- Maduración in vitro de ovocitos inmaduros.
- Mala calidad ovocitaria.
- Congelación-descongelación de óvulos.

Una vez decumulados los ovocitos y preparados los espermatozoides, se procede a realizar el *set up* de la ICSI, es decir, la preparación de la placa de ICSI y la colocación de las pipetas Holding y de microinyección en un micromanipulador acoplado a un microscopio invertido. Una vez que se ha realizado el *set up* se colocan los ovocitos en la placa de microinyección y se procede inmediatamente a la ICSI.

Para la preparación de la placa de ICSI se utiliza el siguiente material:

- Medio P.VP. (polivinil pirrolidona). Vitrolife®, Suecia.
- Placa Falcon, Dinamarca®.
- Medio G-MOPS-PLUS. Vitrolife®, Suecia.
- Pipetas Pasteur (Humagen, USA).
- Pentoxifilina. Ref. ©HEMOVAS, Lab. Robert, España.

La preparación de la placa de ICSI depende de la calidad de la muestra de semen recuperado, aunque existe un modelo estándar para dicha preparación.

Una placa con un *semen normal* se prepara con:

- 3 gotas de 5  $\mu$ L de polivinilpirrolidona (PVP) fresca.
- 3 gotas de 10  $\mu$ L de G-MOPS-PLUS® atemperado para colocar los ovocitos.
- 3 gotas de 20  $\mu$ L de G-MOPS-PLUS® atemperado para lavarlos antes de colocarlos en cada una de las 6 gotas.
- Todo esto cubierto con 9-10 mL de OVOIL® (Vitrolife, Suecia).

Se colocan 6 gotas de G-MOPS-PLUS® porque este es el número máximo de ovocitos que se suelen colocar en una placa de ICSI.

La razón por la que usamos PVP en la ICSI son su alta viscosidad e

incompresibilidad, cualidades que, por un lado, impiden moverse rápidamente a los espermatozoides y posibilitan su manipulación, y, por otro, permiten transmitir inmediatamente la presión ejercida por el microinyector a través del medio con PVP previamente aspirado con la pipeta de microinyección.

En caso de muestras con espermatozoides de mala calidad (biopsia de testículo, aspiración de epidídimo, criptozoospermia, necrozoospermia...) a las que generalmente sólo se les puede hacer un simple lavado, la placa de ICSI se prepara del siguiente modo:

- Varias gotas de 1-5  $\mu$ L de G-MOPS-PLUS® donde se depositarán alícuotas de la muestra.
- Estas alícuotas serán aspiradas del tubo donde está el lavado mediante una pipeta Pasteur estirada a la llama.
- En caso de que no haya espermatozoides móviles, en vez de G-MOPS-PLUS las gotas se preparan con pentoxifilina.
- En caso de que los espermatozoides tampoco se muevan con pentoxifilina, las gotas se preparan con una solución hiposmótica.

La razón de preparar de este modo las placas es la necesidad de tener aislados los espermatozoides antes de colocar los ovocitos en la placa de microinyección, ya que si se trabaja como si se tratara de un semen normal, con los ovocitos dispuestos en la placa de ICSI esperando a ser inyectados a medida que se van encontrando espermatozoides, los ovocitos sufrirían un estrés innecesario dada la dificultad que entraña encontrar espermatozoides en este tipo de muestras.

Para la colocación de las pipetas se utiliza el siguiente material:

- Pipeta de ICSI. Humagen®.
- Pipeta Holding. Humagen®.
- Microscopio invertido con óptica Olympus® y Nikon®.
- Microinyectores. Narishige®.
- Micromanipuladores. Narishige®.

El *set up* propiamente dicho se realiza del siguiente modo:

- Primero se comprueba que la placa térmica, los oculares y los objetivos del microscopio invertido estén limpios y que el sistema del microinyector no

tenga burbujas (producen retardo y brusquedad en la transmisión de la presión).

- Antes de colocar las pipetas en la lanceta se deja de rebosar una gota de aceite por su extremo y entonces la introduciremos con cuidado hasta encontrar resistencia.
- Se enrosca la cabeza de la lanceta y se limpia del aceite que haya podido caer.
- Se coloca el microinyector con la pipeta de holding en el sistema de micromanipulación situado a la izquierda del microscopio invertido.
- Se coloca el microinyector que sostiene la pipeta de microinyección a la derecha.
- Ambas pipetas se colocarán enfrentadas de manera que queden perfectamente horizontales.

Las puntas de las pipetas deben quedar bien dispuestas:

- En el centro del campo visual del microscopio.
- Por debajo del codo de las mismas.

Desde el objetivo de menor aumento las puntas de las pipetas se van recolocando:

- En el centro del campo óptico.
- Cambiando progresivamente a un objetivo mayor.
- Finalizando en el objetivo de 40.
- En este objetivo hemos de tener la máxima libertad de movimiento posible en las tres direcciones del espacio.

Con todo lo anterior preparado, se procede a la inmovilización y aspiración del espermatozoide. La *inmovilización del espermatozoide* se realiza mediante una presión mecánica con la punta de la micropipeta de ICSI sobre su cola, la cual provoca una ruptura de su flagelo. Dicha inmovilización es necesaria tanto para facilitar la manipulación del espermatozoide y que no destruya las estructuras del ovocito una vez dentro de éste, como para facilitar la descondensación del núcleo espermático. La manera de hacerlo depende del origen y la calidad de la muestra seminal.

En los casos de semen normal se van inyectando los ovocitos a medida que vayan encontrando espermatozoides. El procedimiento es el siguiente:

- Siempre es mejor colocar la placa de manera que la gota en la que se trabaja esté en el centro de la placa térmica y mover ésta hacia el objetivo, siendo esto así por las características de la óptica Hoffman que hacen que sólo de este modo se logre tener la máxima visibilidad.

- Se enfoca el borde de una gota de PVP limpia, ya que así estaremos seguros de trabajar en el fondo de la placa, que es donde están dispuestos los espermatozoides.

- Se baja la pipeta de inyección dejando que entre aceite mineral por capilaridad en el interior de la misma (los movimientos en el interior son más suaves).

- Luego hay que aspirar PVP asegurándose de que el sistema responde suavemente a la presión ejercida por el microinyector.

- A continuación se eleva la pipeta y se dirige hacia una gota de P.VP con espermatozoides desde donde se selecciona uno que tenga buena morfología y movilidad.

- En seguida se baja la pipeta de ICSI colocando la punta sobre el tercio proximal de la zona media del espermatozoide.

- Con un movimiento en sentido perpendicular al eje del espermatozoide se ejerce una presión y se dobla el flagelo hasta que éste quede angulado.

- Una vez inmovilizado el espermatozoide, se lleva a una gota de PVP limpia y finalmente se procede a lavarlo para quitarle cualquier resto de plasma seminal (“*debris*”).

- A continuación hay que dirigirse a una gota con un ovocito para realizar la microinyección espermática.

El siguiente paso es la microinyección del espermatozoide comenzando por la colocación y fijación del ovocito:

- Una vez localizado el ovocito, se enfoca la zona media del mismo, que será aquel plano en que aparecen nítidas la membrana plasmática y las paredes externa e interna de la zona pelúcida.

- Se baja la pipeta Holding y la de microinyección hasta que queden en el mismo plano focal.

- Se rota el ovocito hasta que queda visible el corpúsculo polar (CP).

- Se aspira con la pipeta Holding de modo que el ovocito quede inmóvil con el CP en la posición horaria de las 12.00, la 1.00, las 5.00, las 6.00, las 7.00 o las 11.00. Esto es importante ya que la posición del CP nos indica cuál puede ser la posición del huso meiótico.

- Por último, se acerca el espermatozoide a la punta de la pipeta lo máximo posible.

El siguiente paso consiste en la penetración de la zona pelúcida y formación del cono, lo cual se realiza una vez que ya tenemos el espermatozoide en su pipeta listo para ser microinyectado, con el ovocito inmovilizado, correctamente enfocado y colocado:

- Con la pipeta de microinyección se presiona suave y gradualmente sobre la zona pelúcida.

- Una vez traspasada la zona pelúcida, se sigue presionando la membrana del ovocito procurando que se perfile perfectamente un cono alrededor de la pipeta moviéndola de arriba abajo hasta que se consigue.

El siguiente paso es la ruptura de la membrana plasmática del ovocito (*oolema*). La introducción de la pipeta de inyección dentro del ovocito viene determinada por las características de la ZP, de la membrana plasmática y del citoplasma. El oolema se logra romper por aspiración suave hasta que se produce un salto en el interior de la pipeta, lo cual quiere decir que la membrana está rota.

El último paso consiste en la introducción del espermatozoide en el ooplasma:

- Se aspira el ooplasma para asegurarse de que la membrana está rota y además entre contacto con el espermatozoide.

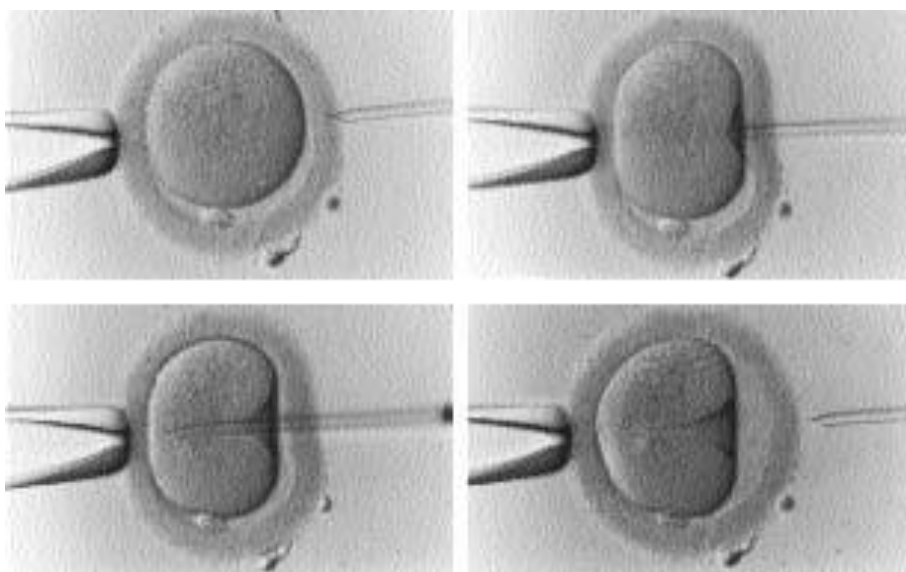
- Se introduce suavemente el espermatozoide procurando que no entre PVP en el ovocito (Fig. 38).

- Se anota el lugar donde queda depositado el espermatozoide, usando como referencia el CP en la posición de las 12 en punto, dividiendo el ovocito en seis cuadrantes.

- Por último, se realiza una clasificación morfológica del ovocito: ooplasma, CP, EP y ZP (ver punto 1.8.1).

- Se lavan y se guardan en placas de cultivo con gotas de G-1 PLUS® (Vitrolife, Suecia).

A las 16-18 horas de la microinyección se evalúa la fecundación.



**Figura 38.** Procedimiento de la ICSI (ver texto).

#### **b) Fecundación in vitro clásica (FIV)**

En el hospital donde se realizó el estudio no se utiliza esta técnica de rutina, salvo en contados casos con numerosos ovocitos donde se realiza una técnica mixta de FIV-ICSI.

La justificación para no usar esta técnica, aunque hoy día siga teniendo sus indicaciones, es por cuestiones de tiempo y evitar fallos fecundativos.

El procedimiento consiste en incubar al ovocito sin decumularlo en medio G-IVF plus® con una alícuota de unos 400.000 espermatozoides y comprobar la fecundación a las 14-16 horas.

#### **c) Transferencia embrionaria (TE)**

La transferencia embrionaria se realiza entre el 2º y 5º día postpunción (D+1...D+5) de forma ambulatoria. Para ello se ha debido producir fecundación de al menos un embrión viable como describiremos a continuación.



El procedimiento quirúrgico es a la vez de simple, extremadamente delicado, ya que del entrenamiento del personal encargado de realizarla depende gran parte del éxito de la FIV. La mayoría de las veces se suele realizar en D+3, para ello se cita a la paciente en el quirófano de RA el día indicado. Se coloca a la paciente en posición ginecológica, se realiza una ecografía para comprobar el estado endometrial y el trazado que tendrá que realizar el catéter de transferencia, además de observar si existe riesgo de SHO según el tamaño de los ovarios y la cantidad de líquido libre intraperitoneal. Se lava la vagina con suero fisiológico y se aspira el moco cervical con una jeringa de 1 mL. Finalmente el embriólogo trae el catéter de transferencia cargado con el/los embriones y el ginecólogo lo deposita en el interior de la cavidad endometrial, con cuidado de no tocar el fondo uterino para no provocar contracciones. Para terminar, el embriólogo comprueba el catéter al microscopio ya que en alguna ocasión no pasan o refluyen los embriones y hay que volver a intentarlo.

### **3.3.3. Protocolo de recogida y almacenamiento de las muestras en el Biobanco**

#### **A. Protocolo de recogida y almacenamiento del PELO**

La muestra de pelo debe ser preferiblemente un mechón de 0,5 mm de diámetro (al menos 100 mg), recogido en la parte posterior de la cabeza y cortado lo más cerca posible del cuero cabelludo. El pelo se inmoviliza mediante pinzas sobre papel blanco y señalando claramente el extremo proximal y el extremo distal al cuero cabelludo. Las muestras se introducen en sobre de papel y se transportan y almacenan a temperatura ambiente y humedad controlada en un lugar libre de humo en el Biobanco del HRU de Málaga hasta su posterior análisis. La muestra de pelo queda identificada con código de origen, código de Biobanco y fecha de recogida.

#### **B. Protocolo de recogida y almacenamiento del LÍQUIDO FOLICULAR**

Se recogieron 4-5 ml. de líquido folicular (LF) en una jeringa estéril de 10 mL sin anticoagulante. Las muestras de LF se procesaron y almacenaron según el siguiente esquema:

- Tipos de tubo de extracción: 1 jeringa con 5 ml líquido folicular a 4°C.

- Condiciones de conservación y procesado:

En caso de no haberse podido procesar inmediatamente (máximo 2 horas desde extracción) se mantuvo la jeringa con el LF en refrigerador a 4°C.

- Para centrifugar:

Se pasaron los LF al tubo de centrífuga y se etiquetaron con código origen.

La centrifugación se realizó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.

- Alicuotado:

- 1 tubo de centrifuga se micropipetea y se pasan alícuotas a los TFC.

- TFC con líquido follicular. Se realizaron alícuotas de 1000 µl. (máximo 3 TFC en cada placa de almacenaje con 2 réplicas de los mismos). El sedimento se desechó. (TFC: tipo de formato de conservación).

- Almacenaje:

- El LF se almacenó en una placa de tubos 2D y se registró en una plantilla EXCEL® (mapas de carga - gine obstetricia) según corresponda.

- Se procede a congelar inmediatamente tras alicuotado en contenedor de nitrógeno líquido a -80°C y su réplica en un segundo contenedor también a -80°C.

### 3.3.4. Determinaciones de analitos

La determinación de potenciales tóxicos en fertilidad puede llegar a ser abrumadora, pero tras revisar la literatura nos pareció interesante seleccionar 4 metales pesados: **ARSÉNICO (AS)**, **CADMIO (Cd)**, **MERCURIO (Hg)** y **PLOMO (Pb)** y se realizó en **PELO y LÍQUIDO FOLICULAR** de la mujer (Bloom, Fujimoto, et al., 2012; Bloom, Kim, et al., 2012; Garcia-Algar et al., 2008). Los análisis de las muestras, como describiremos en el siguiente punto, fueron realizados en el *laboratorio de espectrofotometría de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga (UMA)*.

### 3.3.5. Procedimiento analítico de líquido folicular y pelo

#### A. Instrumentos

- Espectrómetro de masas de plasma por acoplamiento inductivo de alta resolución de sector magnético (HR-ICP-MS), Element XR (Thermo Fisher Scientific®).
- Digestor microondas a presión modelo Multiwave GO (Anton Paar®).

#### B. Reactivos y estándares

- Ácido nítrico Trace Select 69% (Sigma®).
- Peróxido de hidrógeno 30% Trace Select (Sigma®).
- Acetona PA (Sigma®).
- Estándar Cd 1000 µg/mL (Alfa Aesar®).
- Estándar Pb 1000 µg/mL (Alfa Aesar®).
- Estándar Hg 1000 mg/L (Merck®).
- Estándar As 1000 µg/mL (SPC Science®).
- Estándar Au 1000 µg/mL (SPC Science®).
- Estándar Ge 1000 µg/mL (SPC Science®).
- Estándar In 1000 µg/mL (SPC Science®).
- Estándar Bi 1000 µg/mL (Alfa Aesar®).

#### C. Tratamiento de la muestras

Las muestras de folículos se conservaron hasta el momento de su digestión refrigeradas a -80°C y las de pelo a temperatura ambiente con humedad controlada hasta el momento de su análisis. Dependiendo del tipo de muestra se realizaron los siguientes tratamientos previos:

a) **Folículos.** Se pesaron 0,1 g de muestra en un tubo digestor en una balanza analítica con capacidad para medir 0,1mg. Posteriormente se realizó una digestión ácida utilizando un horno digestor microondas a presión modelo Multiwave GO (Anton Paar®).

b) **Pelo.** Las muestras fueron lavadas con acetona y secadas durante toda la noche en una estufa a 30°C. Se pesaron la totalidad de las muestras en un

tubo digestor en una balanza analítica con capacidad para medir 0,1mg. Posteriormente se realizó una digestión ácida utilizando un horno digestor microondas a presión modelo Multiwave GO (Anton Paar®).

Tanto para el Folículo como para el Pelo se utilizó un programa de digestión con 3 mL de ácido nítrico suprapur y 0,5mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Una vez finalizada la digestión, las muestras se enrasaron a un volumen final de 10 mL con agua desionizada calidad 1 (18,2 MΩ·cm).

A cada muestra se le realizó la dilución pertinente, una concentración conocida de Au y de patrón interno.

#### **D. Método de ensayo**

Los datos de las concentraciones de metales en la muestras solicitadas se registraron en la Unidad de Espectrometría Atómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga usando un espectrómetro de masas de alta resolución de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MSHR) ELEMENT XR, que consta de un automuestreador con capacidad para 240 muestras, un sistema de introducción de muestras que a su vez está formado por un nebulizador neumático concéntrico, una cámara de spray ciclónica, bomba peristáltica de cuatro canales y una antorcha de cuarzo, además de un analizador electromagnético de doble enfoque y un sistema de detección que combina un SEM (multiplicador de electrones secundarios) en modo dual (analógico/contaje de pulsos) y un detector de Faraday.

Para el análisis Cuantitativo se realizó una calibración externa a partir de cinco puntos: un blanco de calibración y cuatro patrones de calibración multielemental a los cuales se le adicionaron una concentración conocida de Au y patrón interno así como un volumen de blanco de método.

##### **a) Fundamentos de la técnica**

El plasma de acoplamiento inductivo de argón es usado como una fuente muy eficaz de iones en su estado M<sup>+</sup>. El procedimiento ICP-HRMS está fundamentado en un método físico basado en la detección de iones en su estado M<sup>+</sup>. Se utiliza un sistema de plasma de acoplamiento inductivo para generar dichos iones. El espectro de masas de esta fuente de iones es medido por medio de un espectrómetro de masas de sector magnético,

esto es posible mediante una zona de interfase capaz de introducir los iones del plasma a través de un orificio (cono) por medio de una unidad de vacío diferencial.

El cálculo de la concentración se ha realizado conforme al software del ELEMENT XR (Thermo Fisher Scientific).

**b) Validación del método**

Se realizaron diferentes experimentos para comprobar las figuras de mérito del método.

Se realizaron rectas de calibración para:

- *Fluido folicular* 0,01–1,00 µg/g para Cd, de 0,1–1,0 para Hg y Pb, y de 1,0–10,0 µg/L para As.
- *Pelo humano* 0,01–1,00 µg/g para Cd, de 0,1–10,0 para Hg y Pb, y de 1,0–10,0 µg/L para As.

Se obtuvieron coeficientes de correlación 0,99966 para Cd, 0,99999 para Hg, 0,9999 para As y 0,99939 para Pb.

Al no disponerse de materiales de referencia certificados para comprobar la exactitud del método se realizaron adiciones sobre muestras disponibles en el rango de 3-10 µg/g, aplicando posteriormente todo el proceso de digestión, para comprobar su recuperación, obteniéndose los resultados reflejados en la tabla 17.

**Tabla 17.** Porcentaje de recuperación de metales en pelo y LF tras su digestión.

Recuperación (%)	Cd	Pb	Hg	As
<b>Pelo humano</b>	83	82	100	78
<b>Fluido folicular</b>	67	66	82	88

c) Límite de detección

El límite de detección (LOD) se calculó como 3 veces la desviación estándar de 12 medidas independientes de una muestra de fluido folicular formada por la agrupación de otras muestras y de pelos humanos. Los resultados obtenidos fueron los reflejados en la tabla 18.

**Tabla 18.** Límites de detección (LOD) de los metales pesados estudiados en pelo y LF

Metales	Cd	Pb	Hg	As
Unidades	ng/g	µg/g	µg/g	µg/g
<b>Pelo humano</b>	0,04	0,008	0,09	0,02
<b>Fluido folicular</b>	0,04	0,001	0,05	0,03

Los datos de desviación estándar de las medidas de las muestras se refieren a la repetibilidad de tres medidas instrumentales.

**E. Condiciones Instrumentales**

a) Digestión

Programa: Organic A.

Acidos: 3 ml HNO<sub>3</sub> + 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Rotor: 12 posiciones.

Programa: Rampa 20 minutos a 180°C – Mantenimiento 10 minutos -.  
Enfriamiento.

b) Análisis cuantitativo

Nebulizer Gas Flow: 1,250 L/min.

Auxiliar Gas Flow: 0,90 L/min.

Plasma Gas Flow: 15,50 L/min.

ICP RF Power: 1500 W.

**Tabla 19.:** Parámetros instrumentales HR-ICP-MS

Instrumento	Thermo Fisher Scientific Element XR
Potencia RF	1500 W
Gas plasmógeno	15,5 L/min
Gas auxiliar	0,90 L/min
Gas de nebulización	1,250 L/min
Resolución	Baja (LR) 300 m/ $\Delta$ m Alta (HR) 10.000 m/ $\Delta$ m
Nebulizador	Meinhard
Cámara de nebulización	Ciclónica de cuarzo
Ventana de masas	HR 20% LR 50%
Ventana de búsqueda	HR 100% LR 0%
Ventana de integración	HR 70%
Tiempo de permanencia de la muestra	HR 0,2 s LR 0,01 s
Compensaciones de masa	$^{75}\text{As}$ 0,0044 $^{111}\text{Cd}$ 0 $^{208}\text{Pb}$ 0 $^{202}\text{Hg}$ 0
<b>Series por réplica</b>	3
<b>Pasadas</b>	2
<b>Isótopos medidos (HR)</b>	$^{111}\text{Cd}$ , $^{208}\text{Pb}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{75}\text{As}$
<b>Estándares internos</b>	$^{72}\text{Ge}$ , $^{115}\text{In}$ , $^{209}\text{Bi}$

Los análisis se realizaron en baja resolución para el Cd, Hg y Pb mientras que para el As en alta resolución, determinando el “*Mass Offset*” del método utilizado.

Para la determinación de Cd, Pb, Hg y As se optimizaron los parámetros instrumentales del equipo HR-ICP-MS, obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 19.

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**3.4.1.** Se ha realizado en primer lugar un *estudio descriptivo* con la intención de obtener una visión global de los datos, en los que, para las variables de tipo cualitativo se han determinado las distribuciones de frecuencia, y para las de tipo cuantitativo los estadísticos de tendencia central, dispersión y posición más usuales.

**3.4.2.** En la búsqueda de las posibles relaciones de las variables estudiadas entre sí se han llevado a cabo determinadas técnicas de la *estadística inferencial o analítica* dependiendo de la naturaleza de las variables. Se nos han presentado las siguientes circunstancias:

a) *Dos variables de tipo cualitativo.* Aquí se han calculado las tablas de contingencia con los respectivos porcentajes por filas y columnas, que informan sobre el aspecto descriptivo. Como test de independencia se ha utilizado el test  $\chi^2$  de Pearson. En aquellas situaciones en las que nos aparecían casillas con muy poca frecuencia y por tanto invalidaban la fiabilidad del test (casillas con frecuencia esperada menor a 5, en número superior al 25%) se ha procedido, siempre que ha sido posible, a la unión de las categorías.

b) *Dos variables cuantitativas con distribución distinta a la normal.* Para este estudio utilizamos los tests de Spearman para valorar la posible correlación entre variables continuas sin distribución normal y la intensidad de su asociación mediante el coeficiente Rho.

c) *Una variable cualitativa y una cuantitativa.* Se han utilizado test paramétricos o no paramétricos dependiendo de que los datos siguieran o no una distribución normal. En determinadas situaciones en las que se ha considerado oportuno y más clarificador, la variable continua se ha distribuido en intervalos. Categorizada de esta forma se ha procedido a realizar el test  $\chi^2$  como en el caso anterior.



### **3.5. ASPECTOS ÉTICOS**

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación de Málaga Nordeste. Se respetan los principios de la Declaración de Helsinki. Se siguió la normativa legal sobre la confidencialidad de los datos (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de carácter personal) (LOPD). Se redactó una hoja de información para los posibles participantes y se firmó un impreso de consentimiento informado (ver anexos).

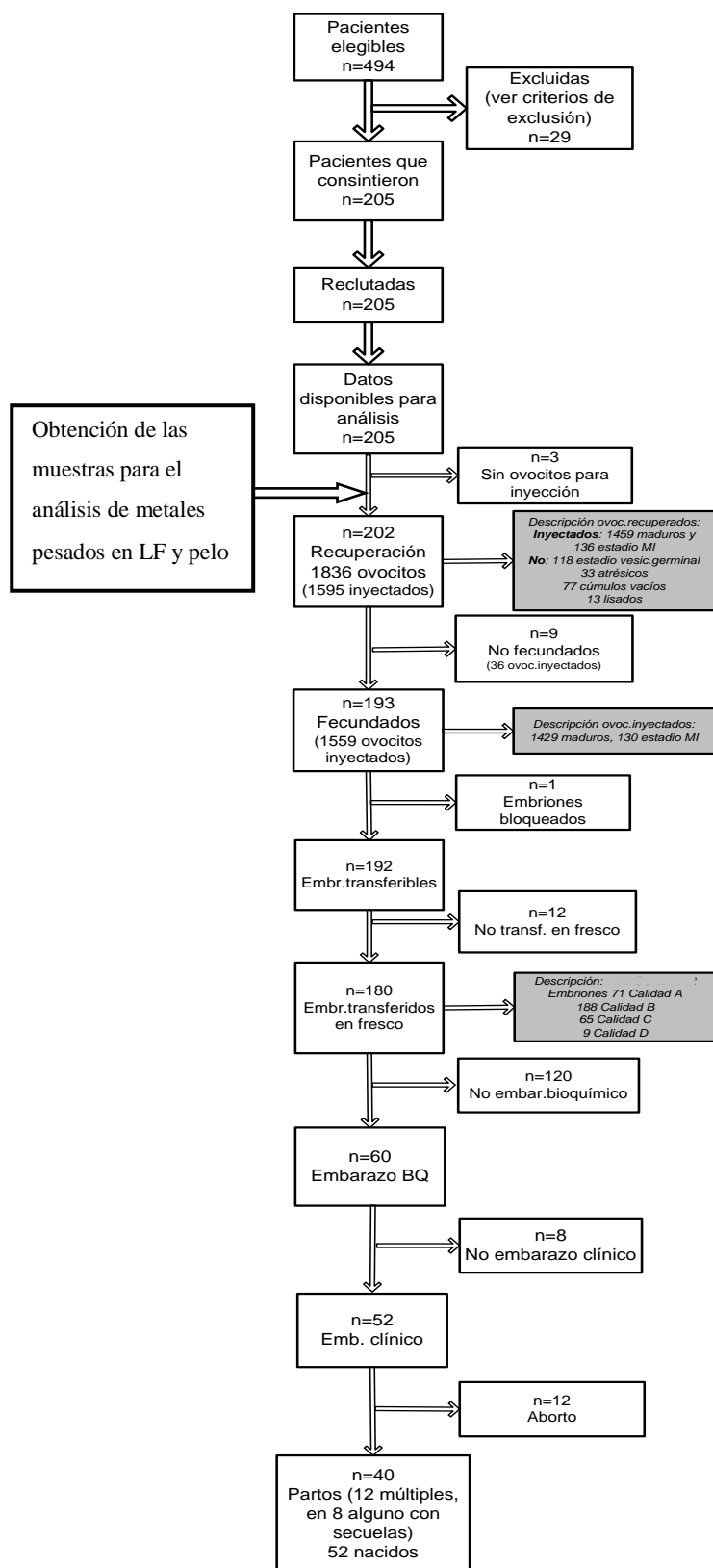


Figura 39. Resumen del proceso de manejo de pacientes para el estudio.



## 4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

Para el estudio descriptivo con el fin de obtener las distribuciones de las variables de nuestra muestra se calcularon los porcentajes y las frecuencias para las variables cualitativas y las medidas de tendencia central, dispersión y curtosis para las cuantitativas.

La población elegible durante el periodo de estudio alcanzaba 494 pacientes, de las cuales fueron reclutadas 234, pero quedaron en 205 debido a que de las 29 restantes, 23 resultaron canceladas antes de la punción ovárica folicular por respuesta inadecuada y 6 se cancelaron después al obtenerse el líquido folicular hemático en 5 casos y endometriósico en 1 (Fig. 39). Por tanto la muestra de población para el estudio queda con **N = 205**.

### A. Variables independientes cuantitativas intrínsecas de la mujer

#### ❖ **Edad de la mujer**

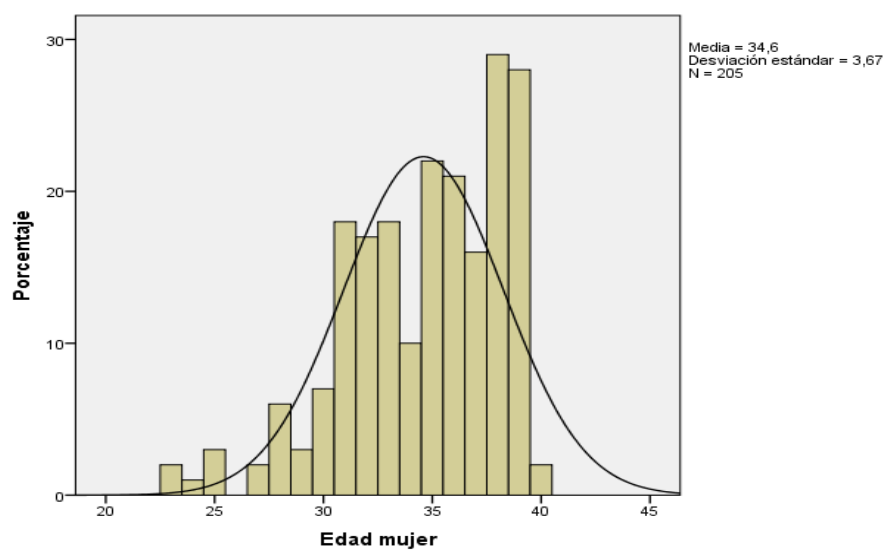
Las pacientes estériles de la población estudiada presentan un rango de edad de 23 a 40 años, con una media de 34,6 y una mediana de 35 años. La distribución por intervalos de edad nos muestra que 118 pacientes, o sea el 57,56% tenía 35 o más años (Tablas 20 y 21) (Figs. 40 y 41). Así pues, nos encontramos con una incidencia de esterilidad de más del doble en las pacientes con 35 o más años, lo cual demuestra que la edad es uno de los factores más importantes a tener en cuenta en esta población.

**Tabla 20.** Distribución de la edad, IMC y tiempo de evolución de la esterilidad

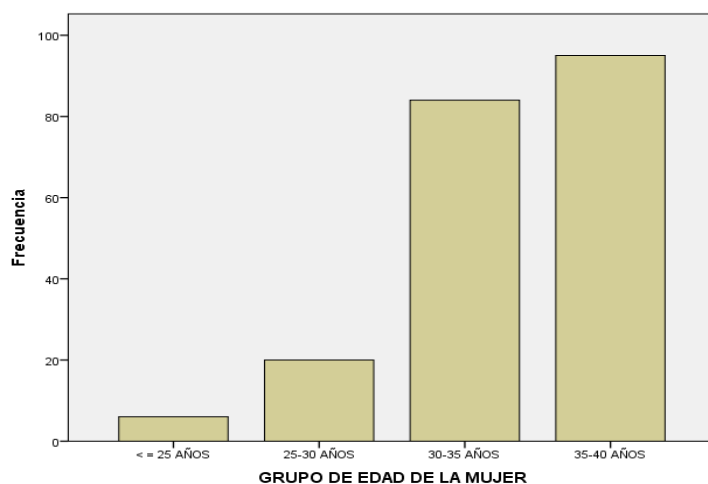
Variables de la paciente	n	Media	DT	Mín	P25	Mediana	P75	Máx
Edad (años)	205	34,4	3,6	23,0	32	35	38	39
Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	205	23,8	3,8	16,7	21	23	26	35,4
Tiempo de evolución de la esterilidad (meses)	205	53,4	25,4	0,0	36	48	60	156

**Tabla 21.** Distribución por edades de las pacientes estériles

Edad	n	%
23	2	1,0
24	1	,5
25	3	1,5
27	2	1,0
28	6	2,9
29	3	1,5
30	7	3,4
31	18	8,8
32	17	8,3
33	18	8,8
34	10	4,9
35	22	10,7
36	21	10,2
37	16	7,8
38	29	14,1
39	28	13,7
40	2	1,0
Total	205	100,0



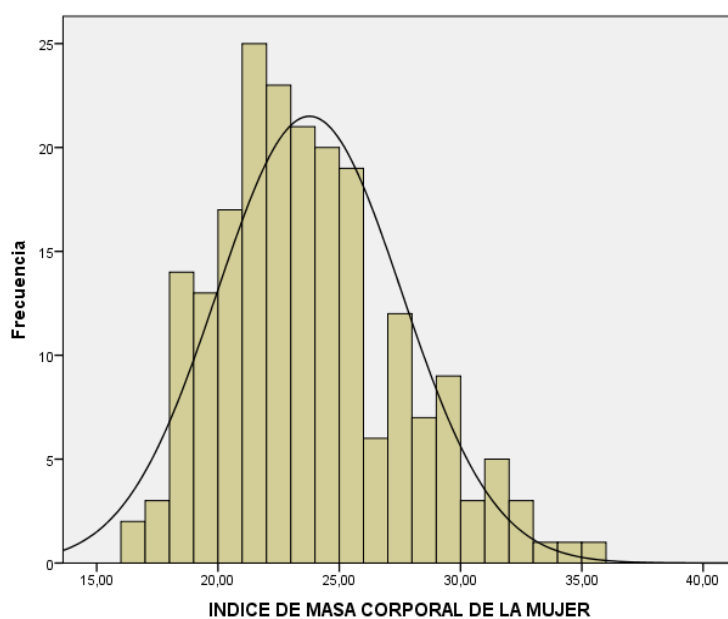
**Figura 40.** Gráfica de la distribución de pacientes estériles por edades.



**Figura 41.** Gráfica de la distirdución de pacientes estériles por grupos de edad.

### ❖ Índice de masa corporal (IMC)

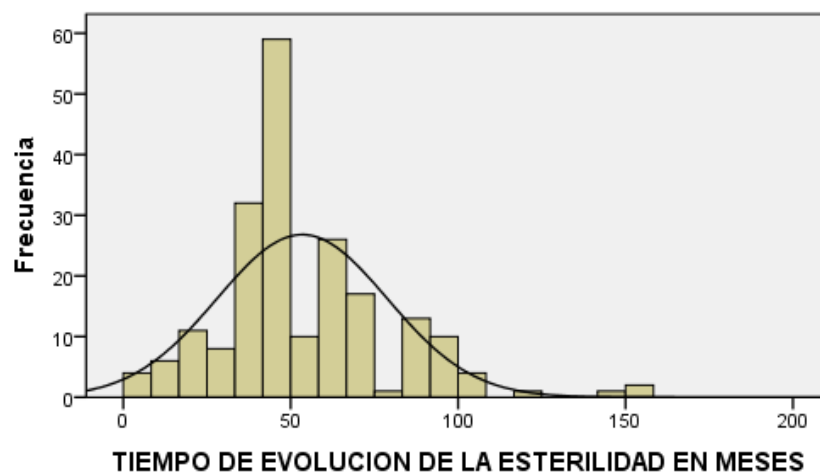
Se observa una media de 23,77 y una mediana de 23, con una distribución prácticamente normal (Tabla 20) (Fig. 42). Bien es cierto que el IMC de la población estudiada no es representativo de la población general estéril, ya que por norma no se admiten para TRA en el Servicio Andaluz de Salud pacientes fuera del rango 18-32.



**Figura 42.** Gáfica de la distribución del IMC de las pacientes estériles.

### ❖ Tiempo de evolución de la esterilidad

Apreciamos como la mediana se sitúa en 4 años, situándose la media en casi 4,5 años. 130 pacientes, o sea el 65% llevaba 2 o más años de espera para intentar tener un hijo, lo cual determina la desesperación de estas mujeres por lograr un objetivo que se percibe inalcanzable a medida que pasa el tiempo (Fig. 43).



**Figura 43.** Representación gráfica de la distribución de la del tiempo de evolución de la esterilidad en meses.

## B. Variables cualitativas independientes sociodemográficas

### ❖ Etnia

Como observamos en la tabla 22, la inmensa mayoría de las pacientes eran europeas (92,2%), con sólo un 7,8% repartido entre sudamericanas y magrebíes.

**Tabla 22.** Distribución de la variables sociodemográficas de las pacientes estériles

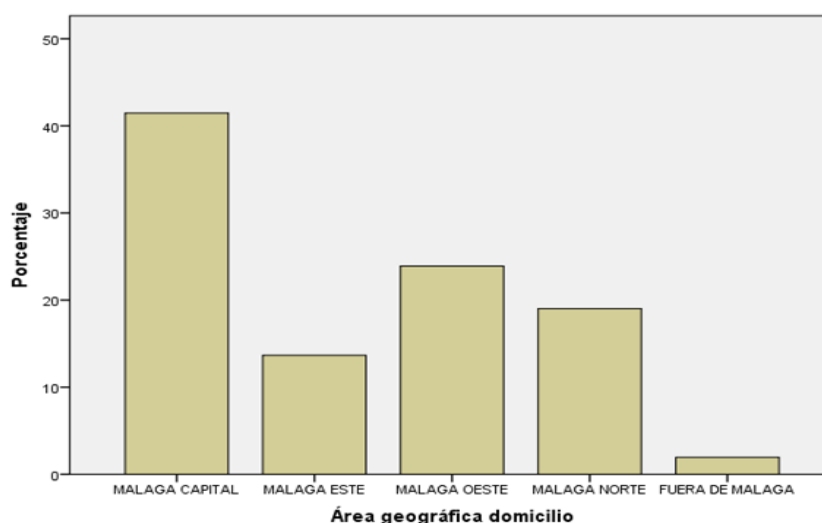
Variables sociodemográficas	n	%
Etnia caucásica	189	92,2
Sin estudios o básicos	40	19,5
Mujer desempleada	33	18,0
Pareja desempleada	7	3,8

### ❖ Lugar de residencia

El lugar de residencia más frecuente de las pacientes estudiadas fue del 41,5% para las de Málaga capital (85 casos) y en segundo lugar, el 23,9%, para las del área de Málaga oeste. En el área metropolitana con código postal 29.010 se acumularon 18 casos (moda) con un 8,8%, que corresponde a la barriada de Teatinos, seguida de la barriada Palma-Palmilla con 9 casos (4,4%). En el segundo lugar de la Capital, fuera del área metropolitana, se encontraba Churriana con 11 casos, o sea un 5,4%. La zona de Torremolinos y Benalmádena se repartían 9 casos cada una sumando un 18,8% (Tabla 23) (Fig. 44).

**Tabla 23.** Distribución de la lugar de residencia.de las pacientes estériles

<b>Lugar de residencia</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Málaga capital	85	41,5
Málaga este	28	13,7
Málaga oeste	49	23,9
Málaga norte	39	19,0
Fuera de Málaga	4	2,0
<b>Total</b>	<b>205</b>	<b>100,0</b>



**Figura 44.** Gráfica de la distribución por área geográfica de las pacientes estériles.



### ❖ Nivel académico

Sin estudios, o básicos y primarios observamos un 19,5% de pacientes (40 casos), el resto poseían un nivel de instrucción alto en segundo lugar y medio en tercer lugar (Tabla 24).

**Tabla 24.** Distribución del nivel académico de la mujer

<b>Nivel académico</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sin estudios	3	1,5
Estudios primarios	37	18,0
Estudios secundarios	77	37,6
Estudios universitarios	88	42,9
Total	205	100,0

### ❖ Actividad profesional

En el desempleo se encontraba el 16,1% de las pacientes. La mayoría pertenecía a la categoría de trabajadores por cuenta ajena, o sea 125 casos, representando el 61% (Tabla 25).

**Tabla 25.** Distribución de la categoría profesional de la paciente estéril.

<b>Categoría profesional de la mujer</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Desempleo	33	16,1
Trabajador por cuenta propia sin asalariados	22	10,7
Trabajador por cuenta propia con 10 o más asalariados	4	2,0
Trabajador por cuenta propia con menos de 10 asalariados	5	2,4
Gerente de una empresa con 10 o más asalariados	2	1,0
Capataz, supervisor o encargado	14	6,8
Otro asalariado	125	61,0
Total	205	100,0

### C. Estilos de vida y alimentación

#### ❖ **Ejercicio físico durante la última semana previa al ciclo de FIV**

El 54,1% no realizó ejercicio físico durante la última semana y sólo el 18,6% lo hicieron más de 3 horas. El análisis inferencial lo realizamos con estos mismos parámetros (Tabla 26).

**Tabla 26.** Distribución de la realización de ejercicio físico durante la última semana por la paciente

Frec. ejercicio	n	%
Nada	111	54,1
< 1 hora	21	10,2
1-2 horas	22	10,7
2-3 horas	13	6,3
3-4 horas	11	5,4
4-5 horas	6	2,9
5-6 horas	7	3,4
6-7 horas	4	2,0
> 7 horas	10	4,9
Total	205	100,0

#### ❖ **Tabaco**

Sólo un 11,2% abandonó el tabaco durante el ciclo, observándose que prácticamente no hay cambio del hábito tabáquico. Encontramos un 68,3% de no fumadoras, frente a un 31,7% que sí lo hizo en algún momento (Tablas 27 y 88). Para el análisis de la varianza tomamos 65 casos (38,5%) que declararon haber fumado en alguna ocasión.

**Tabla 27.** Distribución del consumo de tabaco antes del ciclo de FIV

<b>Tabaco antes FIV</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
NO CONSUMO	140	68,3
1-5	22	10,7
6-10	20	9,8
11-15	17	8,3
16-20	4	2,0
>20	2	1,0
Total	205	100,0

**Tabla 28.** Distribución del consumo de tabaco durante el ciclo de FIV

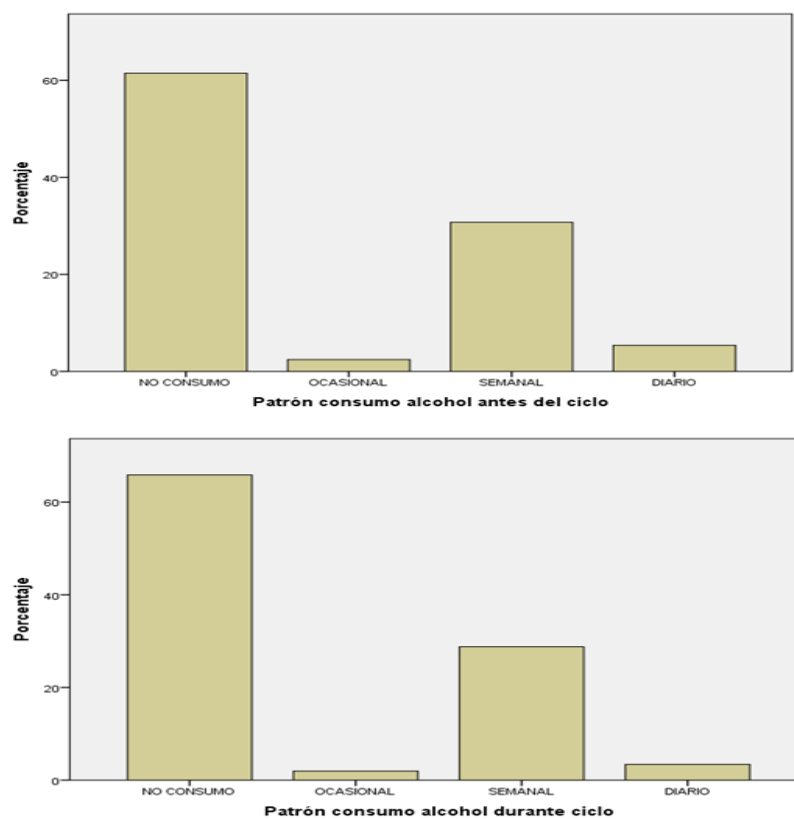
<b>Tabaco durante FIV</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
NO CONSUMO	163	79,5
1-5	17	8,3
6-10	17	8,3
11-15	6	2,9
>20	2	1,0
Total	205	100,0

### ❖ Alcohol

Con el alcohol ocurrió lo mismo que con el tabaco, disminuyendo el consumo sólo un 4,4%, pasando de un 61,5% de no bebedoras antes del ciclo a un 65,9% durante el ciclo. La mayoría siguió un patrón de consumo de fin de semana del 30,7% antes y 28,8 durante el ciclo de FIV. En cuanto a la cantidad de bebida antes del ciclo, la mayoría (20,1%) ingería entre 2 y 4 UBE, pasando a 17,6% durante el ciclo. Si preguntamos por el tipo de bebida, el 24,4% declaró cerveza y/o vino, el 4,4% sólo bebidas destiladas de alta gradación y el 9,8% ingería mezcla de todas. Para el análisis estadístico de la varianza consideramos 79 pacientes (38,5%) que declararon haber bebido en alguna ocasión (Tablas 29 y 30) (Figs. 45 y 46).

**Tabla 29.** Distribución del patrón de consumo de alcohol de las pacientes

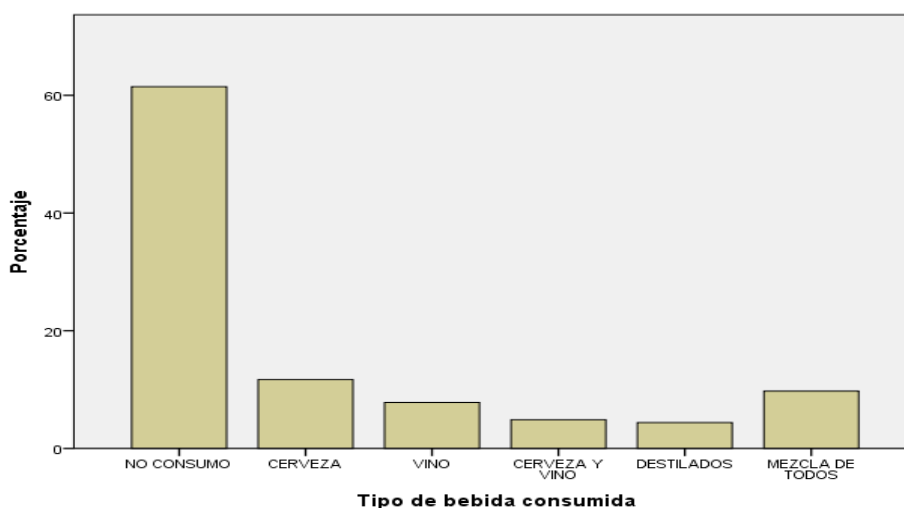
Patrón consumo alcohol	n	%
No consumo	135	65,9
Ocasional	4	2,0
Semanal	59	28,8
Diario	7	3,4
Total	205	100,0



**Figura 45.** Gráfico del patrón de consumo de alcohol de las pacientes antes y durante el ciclo de FIV.

**Tabla 30.** Tipo de bebida alcohólica consumida por las pacientes

<b>Tipo de bebida alcohólica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
No consumo	126	61,5
Cerveza	24	11,7
Vino	16	7,8
Cerveza y vino	10	4,9
Destilados	9	4,4
Mezcla de todos	20	9,8
Total	205	100,0



**Figura 46.** Gráfico del tipo de bebida alcohólica consumida po las pacientes antes y durante el ciclo de FIV.

## ❖ Café

El café no mostró ningún cambio de patrón de consumo y tomamos 159 casos, 77,6% que consumían café semanal o diario para el análisis de la varianza (Tabla 31).

**Tabla 31.** Distribución del patrón de consumo de café antes y durante la FIV

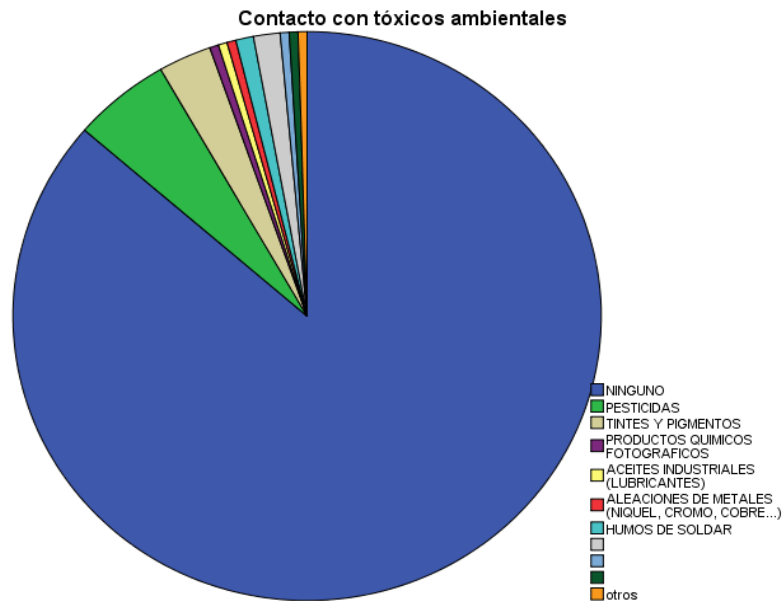
Consumo de café	n	%
No consumo	11	5,4
Ocasional	35	17,1
Semanal	51	24,9
Diario	108	52,7
Total	205	100,0

### ❖ Exposición directa a tóxicos medioambientales

En el cuestionario detectamos 28 pacientes con riesgo de exposición a tóxicos medioambientales (13,7%), encontrando que los más frecuentes eran pesticidas con 12 casos y tintes y pigmentos con 7 casos (Tabla 32). Usamos el mismo corte para el análisis de la varianza.

**Tabla 32.** Distribución de la exposición a tóxicos medioambientales de las pacientes de FIV

Exposición a tóxicos ambientales	n	%
Ninguno	177	86,3
Pesticidas	11	5,4
Tintes y pigmentos	6	2,9
Productos químicos fotográficos	1	,5
Aceites industriales (lubricantes)	1	,5
Aleaciones de metales (níquel, cromo, cobre...)	1	,5
Humos de soldar	2	1
Otros	8	4,0
Total	205	100,0



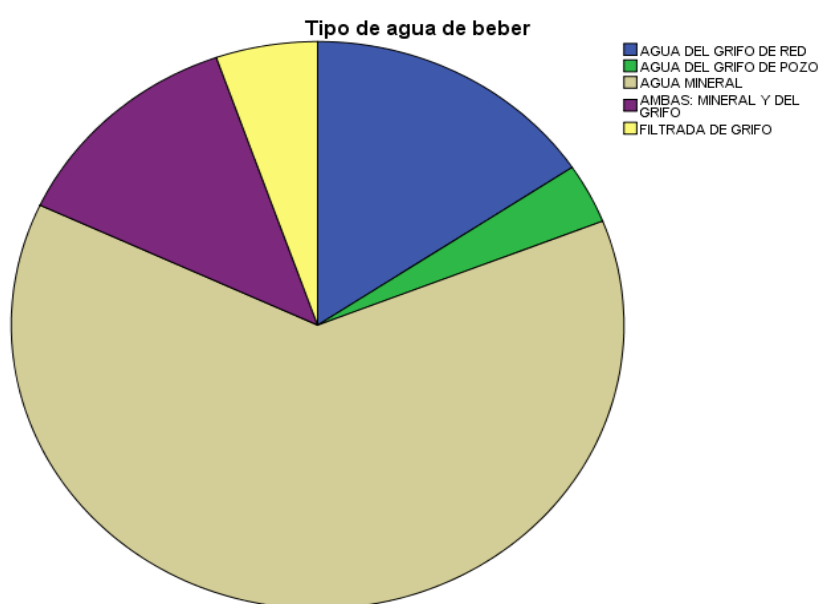
**Figura 47.** Distribución de la exposición a tóxicos medioambientales de las pacientes de FIV

### ❖ Agua

En el patrón de consumo de agua encontramos 23 casos (11,2%) que sólo consumía agua mineral y lo seleccionamos como corte para el análisis de la varianza. Para cocinar 137 pacientes lo hacían exclusivamente con agua del grifo, o sea el 66,8%, mientras que para beber consumían exclusivamente agua mineral 129 (62,9%) pacientes. (Fig. 48 y 49).



**Figura 48.** Distribución del consumo de agua para cocinar de las pacientes de FIV



**Figura 49.** Distribución del consumo de agua para beber de las pacientes de FIV



## ❖ Alimentación

Atendiendo al tipo de alimentación, el consumo de ensalada 2-4 veces por semana fue el más frecuente con un 39% (80 casos). Para el análisis de la varianza tomamos el percentil 25 (P25) con 45 casos (21,95%). Lo mismo hicimos con el resto de los alimentos.

Con el consumo de huevos observamos que el 46,8% estaba por debajo del P25 con menos de 2 por semana. Entre 2-4 veces por semana fue el consumo más frecuente con un 49,3% (101 casos).

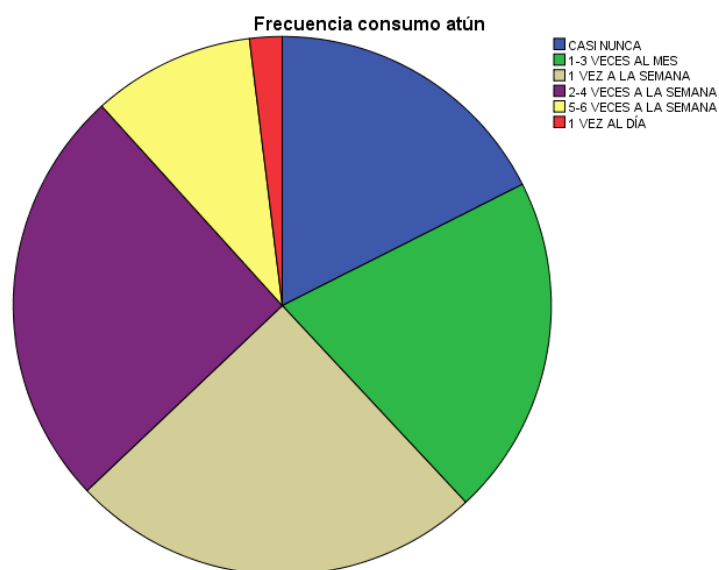
El P25 del consumo de la suma de carne de pollo, cerdo y vacuno fijado en menos de 14 raciones mensuales supuso el 27,3% con 56 casos. El cerdo se consumía de forma más frecuente 1 vez por semana con un 28,3% (58 casos). El vacuno también se consumía con mayor frecuencia 1 vez por semana en un 27,3% (56 casos). El pollo se consumía con mayor frecuencia 2-4 veces a la semana con un 57,1% (117 casos).

El consumo de pescado resultante de la suma de merluza o similar, rosada, sardinas y boquerones tuvo su P25, con menos de 4 raciones mensuales, en el 33,7% (69 casos). La merluza o similar en el 60% de los casos se consumía menos de 3 veces al mes y en el 29,8% 1 vez a la semana. La rosada en el 67,3% de los casos se consumía menos de 3 veces al mes. Las sardinas y los boquerones, aunque parezca insólito en nuestro entorno, se consumían respectivamente en un 90,7 y 78,6% con un patrón de menos de 3 veces al mes.

El consumo de atún lo consideramos por separado para estudiar su relación específica con el Hg y las tasas de gestación en nuestro estudio y el P25 se situó en el 62,9% (129 casos) con menos de 2 raciones por semana. El patrón de consumo detallado de atún se recoge en la tabla 33 y figura 50.

**Tabla 33.** Distribución del patrón de consumo de atún de las pacientes de FIV

<b>Frecuencia consumo atún</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Casi nunca	36	17,6
1-3 veces al mes	42	20,5
1 vez a la semana	51	24,9
2-4 veces a la semana	52	25,4
5-6 veces a la semana	20	9,8
1 vez al día	4	2,0
Total	205	100,0



**Figura 50.** Distribución de la frecuencia de consumo de atún de las pacientes de FIV.

El P25 del consumo de mariscos y moluscos lo obtuvimos al sumar el de gambas o similar, camarones, mejillones, cangrejos y almejas y el resultado fue para menos de 2 raciones al mes del 32,7% (67 pacientes). La frecuencia de consumo resultó ser muy baja, excepto en los mejillones con un consumo del 37,1% entre 1-3 veces al mes.

Para terminar con la alimentación, el consumo de conservas en general estableció un P25 en menos de 2 veces por semana en el 82,4% (169 casos).

En la tabla 34 resumimos los P25 de las variables de hábitos tóxicos, de exposición ambiental y de alimentación que utilizaremos para el estudio analítico posterior.

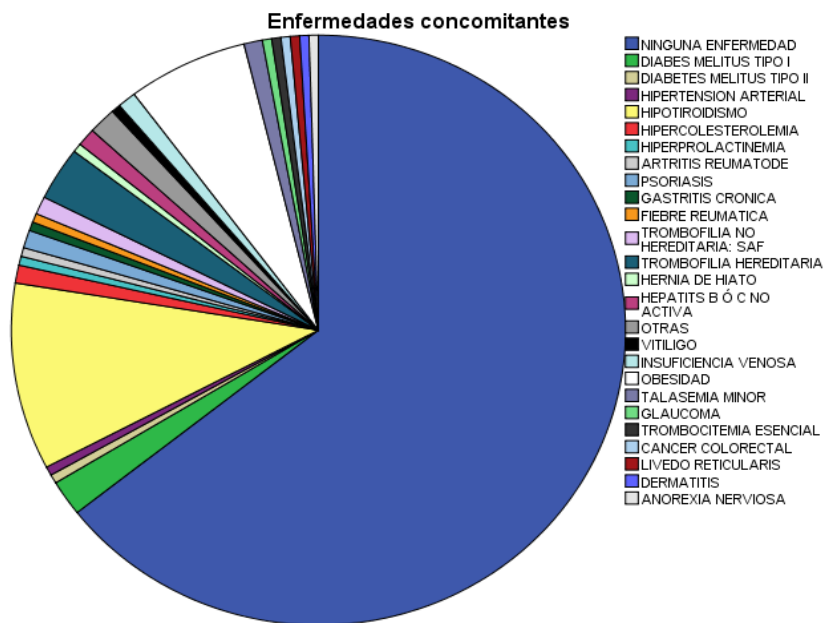
**Tabla 34.** Resumen de distribución de frecuencias de hábitos y exposición a tóxicos y alimentación en pacientes estériles que utilizaremos para el estudio analítico

<b>Hábitos y exposición a tóxicos y alimentación</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
No realizó ejercicio físico la semana pasada	111	54,1
Fumadora en alguna ocasión	65	31,7
Consumo de café semanal o diario	159	77,6
Consumió alcohol en alguna ocasión	79	38,5
Expuesta a tóxicos ambientales	28	13,7
Consumo sólo de agua mineral	23	11,2
Ensalada en dieta <2 veces/semana	45	22,0
Consumo de huevos <2 veces/semana	96	46,8
Consumo de carne <14 raciones/mes	56	27,3
Consumo de pescado <4 raciones/mes	69	33,7
Consumo de mariscos <2 raciones/mes	67	32,7
Consumo de atún <2 veces/semana	129	62,9
Consumo de conservas <2 veces/semana	169	82,4

#### **D. Variables independientes de antecedentes personales**

##### **❖ Patología médica**

La patología de base más frecuente encontrada fue el hipotiroidismo con 24 casos (11,7%), seguida de obesidad leve-moderada con 13 casos (6,3%). 73 pacientes padecían algún tipo de enfermedad lo que representó un 35,6% (Fig. 51). Este último valor fue el seleccionado para el análisis de la varianza. Los tipos de patologías generales observados se recogen en la gráfica adyacente (Fig. 51).



**Figura 51.** Gráfica de la distribución de las frecuencias de enfermedades generales en las pacientes de FIV.

Existía algún tipo de alergia en 32 pacientes, representando un 15,6% del total, resultando la más frecuente la polínica y al pelo de animal con 11 casos (5,4%). El valor del total de la variable alergias fue el que utilizamos para el análisis de la varianza.

### ❖ Patología quirúrgica abdominopélvica

50 pacientes (24,4%) habían sufrido una laparoscopia y/o una laparotomía previas al ciclo de FIV. Así lo consideramos para el análisis de la varianza.

Desde este punto, si no manifestamos lo contrario, ***los valores presentados serán los que tomaremos más adelante para el estudio estadístico analítico.***

41 pacientes, o sea, un 20% fueron sometidas a una histeroscopia y/o a un legrado ginecológico (Tabla 35).

**Tabla 35.** Antecedentes médicos, quirúrgicos y obstétricos en pacientes estériles que utilizaremos para el estudio analítico

<b>Antecedentes patológicos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Existían comorbilidades	73	35,6
Existían alergias	32	15,6
Laparoscopia o laparotomía previa	50	24,4
Histeroscopia o legrado previo	41	20,0
Pérdidas reproductivas previas	48	23,4

### ❖ **Pérdidas reproductivas previas**

El 23,48% de las pacientes sufrió alguna pérdida reproductiva anterior al ciclo de FIV (Tabla 25), con lo que observamos que en esta población casi se duplica la incidencia de aborto con respecto a la población general.

## **E. Origen de la esterilidad**

### ❖ **Factor femenino**

Se contabilizaron 52 casos, o sea, un 25,4% de esterilidad de origen femenino (Tabla 26) (Fig. 52). El 15,2% padecía de endometriosis, el 14% de anovulación, el 6,8% de SOP, el 27,3% tenía más de 38 años, el 9,7% baja respuesta, el 9,3% factor tubárico bilateral y el resto otras causas. Una vez más, vemos como la edad de la mujer sigue siendo la protagonista de todo el proceso.

### ❖ **Factor masculino**

Se presentaron 45 casos de esterilidad exclusivamente de origen masculino, es decir, un 22% (Tabla 26) (Fig. 52).

### ❖ **Esterilidad mixta masculina y femenina**

Los 83 casos encontrados representan la causa más numerosa con un 40,5% (Tabla 26) (Fig 52).

### ❖ **Esterilidad de origen desconocido**

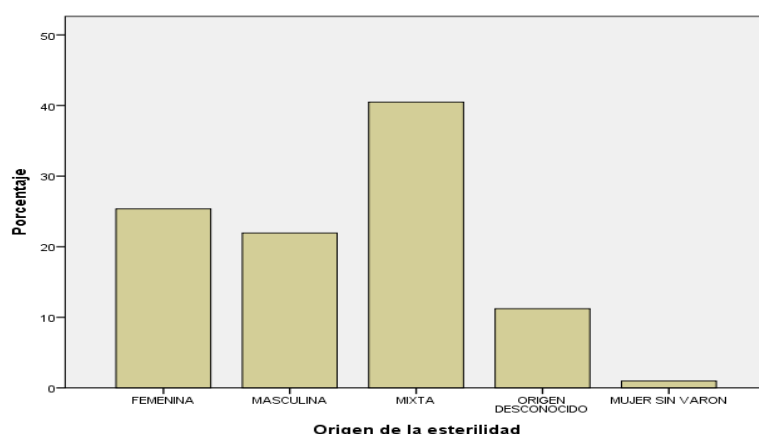
La EOD se presentó en el 11,2% de los casos, es decir, en 23 pacientes (Tabla 26) (Fig. 52).

### ❖ **Mujer sola sin pareja masculina**

Este grupo no se considera esterilidad propiamente dicha, pero como acuden a TRA cumpliendo algún criterio de FIV la incluimos en este apartado. Sólo hubo 2 casos, representando el 1% (Tabla 36) (Fig. 52).

**Tabla 36.** Distribución de frecuencias del origen de la esterilidad

<b>Origen de la esterilidad</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Factor femenino	52	25,4
Factor masculino	45	22,0
Factor masculino y femenino	83	40,5
Desconocido	23	11,2
Mujer sin varón	2	1,0



**Figura 52.** Gráfica de la distribución de frecuencias del origen de la esterilidad.

#### **F. Analítica hormonal en el último año.**

Destacamos la existencia de 40 casos (19,5%) con una concentración de estradiol en sangre por encima de 70 pg/mL, lo cual se considera un indicador de baja respuesta a la HEOC. Por otro lado la concentración en sangre de TSH estuvo por encima de 2,5 mUI/mL en el 26,3% (54 pacientes), el cual se considera hoy día el punto de corte, ya que por encima de él existen evidencias de que empeoran los resultados de las TRA y aumenta el riesgo de aborto. FSH basal por encima de 12 mUI/mL (indicador clásico de baja reserva ovárica) hubo solo un 2,9% de los casos (Tabla 37).

**Tabla 37.** Analítica hormonal en el último año de las pacientes estériles

<b>Resultados analítico hormonal último año</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
FSH basal durante el último año patológico ( $\geq 12$ mUI/ml)	6	2,9
Cociente LH/FSH patológico ( $\geq 2$ )	7	3,4
Estradiol basal durante el último año patológico ( $\geq 70$ pg)	40	19,5
PRL basal durante el último año patológico ( $\geq 30$ UI)	7	3,4
TSH basal durante el último año patológico ( $\geq 2,5$ UI)	54	26,3

### G. Determinaciones de metales pesados en líquido folicular

Al realizar los cálculos con los estadísticos de tendencia central, dispersión y posición, observamos que ninguna de las concentraciones de los metales analizados en líquido folicular seguía una *distribución normal* al no cumplirse criterio alguno para ello. Este hallazgo constituye uno de los *objetivos* de la presente Tesis Doctoral (Tabla 38).

Destacar que 47 casos (22,9%) de Cd en LF estuvieron por debajo del límite de detección (LOD).

**Tabla 38.** Determinación de metales pesado en líquido folicular y pelo

<i>Determinación de metales pesados</i>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DT</b>	<b>Mín</b>	<b>P25</b>	<b>Mediana</b>	<b>P75</b>	<b>Máx</b>
Concentración de As en folículo ovárico (microg/g)	199	0,1	0,1	0,0	0,0388	0,0615	0,0910	0,301
Concentración de Cd en folículo ovárico (nanog/g)	158	0,8	1,1	0,0	0,1405	0,4920	1,1075	8,819
Concentración de Hg en folículo ovárico (microg/g)	172	0,0	0,1	0,0	0,0010	0,0070	0,0080	0,664
Concentración de Pb en folículo ovárico (microg/g)	169	0,0	0,1	0,0	0,0030	0,0060	0,0140	0,602
Concentración de As en pelo (microg/g)	144	0,1	0,3	0,0	0,0110	0,0240	0,1040	2,418
Concentración de Cd en pelo (nanog/g)	198	76,0	301,0	0,8	12,4225	26,9510	62,5325	3777,819
Concentración de Hg en pelo (microg/g)	200	1,3	1,2	0,0	0,5640	0,9200	1,5970	8,577
Concentración de Pb en pelo (microg/g)	199	2,1	4,3	0,0	0,4460	0,9650	1,9668	36,414

### H. Determinaciones de metales pesados en pelo

En pelo sucedió lo mismo que en LF, ya que al realizar los cálculos con los estadísticos de tendencia central, dispersión y posición, observamos que ninguna de las concentraciones de los metales analizados en esta matriz biológica seguía una *distribución normal* al no cumplirse criterio alguno para ello. Este hallazgo también constituye uno de los *objetivos* de la presente Tesis Doctoral (Tabla 38).

Destacar que 61 casos (29,7%) de As en pelo estuvieron por debajo del LOD.



## **I. Hiperestimulación ovárica controlada, utilización de adyuvantes y ciclos previos realizados**

Respecto a la HEOC, calculamos la distribución de frecuencias de los tipos de protocolos de gonadotropinas utilizados y la necesidad de ajuste de dosis de FSH y LH. La distribución de frecuencias de las variables FSH sola, FSH + LH (combo), dosis precisadas en UI de FSH y de LH, se hallaron para el P75. A destacar que el 54,1% se estimuló con FSH y el resto con FSH + LH. El 57,6% precisó más de 2700 UI de FSH y más de 12 días de estimulación, mientras que el 64,4% precisó ajuste de dosis de FSH. En cuanto a la utilización de LH, se administró al 45,9% de las pacientes, el 22,9% precisó más de 1300 UI y el 31,2% más de 11 días. El ajuste de dosis de LH fue necesario en el 23,4% de las pacientes.

Se emplearon adyuvantes para la HEOC en el 10,7% de las pacientes para intentar mejorar la respuesta a las gonadotropinas.

Por otro lado, aunque la realización de ciclos previos y de cancelación de alguno de ellos pertenece al apartado de antecedentes, decidimos incluirlos aquí por estar también relacionados con la HEOC. El 39,5% de las pacientes se había realizado algún ciclo previo, mientras que el 9,8% sufrió alguna cancelación del mismo (Tabla 39).

**Tabla 39.** Distribución de frecuencias de la HEOC en las pacientes de FIV

<b>Estimulación ovárica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Protocolo FSH	111	54,1
Protocolo combo	94	45,9
FSH: 12 días o más	118	57,6
FSH: 2700 UI o más	118	57,6
FSH: Variación de la dosis durante el ciclo	132	64,4
LH: 11 días o más	64	31,2
LH: 1300 UI o más	47	22,9
LH: Variación de la dosis durante el ciclo	48	23,4
Empleo de adyuvantes	22	10,7
Realización de ciclo previo	81	39,5
Cancelación de ciclo previo	20	9,8

## **J. Resultados de la FIV/ICSI**

Consideramos *resultados* a partir de que la paciente ha finalizado la fase de HEOC y se administra 250 µg de hCG-r para desencadenar la ovulación.

### **❖ Ovocitos**

Se puncionaron 2418 folículos recuperándose 1861 cúmulos ovígeros. Hubo 3 pacientes que no tuvieron ovocitos viables para seguir con el proceso. La proporción de cúmulos / folículos fue del 77%. Tras la decumulación se comprobó que 1459 eran MII (media 7,2) y 136 eran MI (media 0,7), el resto eran inmaduros. La proporción de ovocitos maduros o MII fue del 79,3% (Tablas 30 y 31).

### **❖ Fecundación**

Se logró la fecundación de 982 ovocitos (media 7,1) y 120 de ellos (media 0,6) lo hicieron de forma anómala con 3 pronúcleos y otras variantes. 601 ovocitos no se fecundaron. La proporción de ovocitos fertilizados fue del 63%. No se logró la fecundación de ningún ovocito en 9 pacientes. Hubo 5 casos en los que se indicó técnica mixta FIV / ICSI al tener disponibles más de 15 ovocitos maduros-cúmulos ovígeros y la proporción de fertilización fue del 36% (9 / 25) (Tabla 32).

### **❖ Embriones**

- *Generados*: se generaron 887 embriones en 193 pacientes (media 4,6), de los cuales 111 fueron de calidad A, 400 de calidad B y el resto C y D. La velocidad o ritmo de división celular fue normal en 649 embriones (media 3,49), lenta en 182 casos y rápida en 17. Una paciente tuvo un único embrión y se bloqueó en D+2 por lo que no pudo continuar con el proceso (Tabla 33).

- *Transferibles*: restando la del embrión bloqueado, quedan 192 pacientes con embriones transferibles en fresco (Tabla 34).

### ❖ Transferencia embrionaria

De las 192 pacientes con embriones transferibles, se pudo realizar transferencia embrionaria en fresco en 180. En 10 de las pacientes hubo que vitrificar todos los embriones por riesgo de SHO y en 2 por otras causas.

En total hubo 333 embriones transferidos en fresco, de los cuales 71 eran de calidad A (media 0,4), 188 de calidad B (media 1), 65 de calidad C (media 0,4) y 9 de calidad D (media 0,1). El número total de células de los embriones transferidos fue de 2078 con un promedio de 6,2 células por embrión.

Se realizaron 118 transferencias en D+3 (65,6%), 61 en D+2 (33,9%) y una en D+4 (0,5%) (Tabla 35).

### ❖ Gestaciones

- *Embarazos bioquímicos*: en total se obtuvieron **60 casos** detectados con  $\beta$ -hCG en suero de la paciente, lo que representa el 33,3% de las 180 transferencias embrionarias realizadas en fresco (Tabla 36).

- **Gestaciones clínicas**: en total se registraron 52 casos de gestaciones clínicas con al menos un saco intrauterino detectados por ecografía, lo que representa el 28,9% de gestaciones logradas por transferencia realizada.

- *Abortos*: en total hubo 12 casos, representando el 6,7% del total de transferencias.

- *Embarazos ectópicos*: hubo 1 caso de embarazo ectópico tubárico y 1 caso de embarazo heterotópico, lo cual representa el 1,1% de las transferencias embrionarias realizadas en fresco.

### ❖ Partos

Hubo un total de **40 partos** cuyos datos esenciales se recogen en la tabla 37. Destaca la alta tasa de prematuridad con el 37,5%; la alta tasa de recién nacidos de bajo peso con el 32,5% y la alta tasa de partos gemelares con un 30 %. La tasa de cesáreas se

quedó en el 35% y superó en 6 puntos porcentuales la del Hospital Materno Infantil de Málaga que se situó en el 29% en el mismo año del estudio (Memoria UGC Obstetricia y Ginecología, 2014). Si se recoge la variable cualquier tipo de anomalía detectada tras el nacimiento al realizar una encuesta telefónica a las madres, se observó que 8 recién nacidos presentaban defectos de pared (6 casos con hernia inguinal o umbilical y 2 con otras anomalías) (Tabla 48).

En las tablas sucesivas se expresan los resultados obtenidos tras el proceso de la FIV/ISI.

**Tabla 40.** Resultados de folículos puncionados en FIV/ICSI

Resultados de folículos/ punción	n	Media	DT	Mín	P25	Mediana	P75	Máx	Total
Nº de folículos >17mm desarrollados	205	11,6	4,6	3,0	8	12	14	29	2386
Nº de folículos >17mm puncionados	205	11,8	4,9	2,0	8	12	15	29	2418
Nº de cúmulos ovígeros recuperados	202	9,2	4,8	1,0	6	8	11	25	1861
Proporción de ovocitos recuperados por punción (%)	202	77,0	21,3	16,7	63	80	100	100	

**Tabla 41.** Resultados de ovocitos recuperados tras la punción ovárica folicular

Resultados de ovocitos/ punción	n	Media	DT	Mín	P25	Mediana	P75	Máx	Total
Nº de ovocitos en estadio M II	202	7,2	4,0	1	4	6	10	20	1459
Nº de ovocitos en estadio M I	202	0,7	1,1	0	0	0	1	7	136
Nº de ovocitos en estadio de vesícula germinal	202	0,6	1,1	0	0	0	1	8	118
Nº de ovocitos atrésicos	202	0,2	0,4	0	0	0	0	2	33
Nº de ovocitos en cúmulos vacíos	202	0,4	0,7	0	0	0	1	5	77
Nº de ovocitos lisados	202	0,1	0,3	0	0	0	0	3	13
Proporción de ovocitos maduros (%)	202	79,3	18,7	12,5	66,7	81,8	100,0	100	
Razón de ovocitos maduros / no maduros	145	4,2	3,8	0,1	1,8	3,0	5,0	20	

**Tabla 42.** Resultados de ovocitos fecundados tras la FIV/ICSI

Ovocitos fecundados	n	Media	DT	Mín	P25	Mediana	P75	Máx	Total
Nº de ovocitos en estadio M II	193	7,4	4,0	1	4	6	10	20	1429
Nº de ovocitos en estadio M I	193	0,7	1,1	0	0	0	1	7	130
Nº de ovocitos fecundados	193	5,1	3,4	1	3	4	7	19	982
Nº de embriones con fecundación anómala	193	0,6	1,1	0	0	0	1	6	120
Nº de ovocitos no fecundados	193	3,1	2,6	0	1	3	4	13	601
Proporción de ovocitos fertilizados (%)	193	63,0	24,3	12,5	48,1	63,6	80,6	118,75	

**Tabla 43.** Embriones generados, calidad y ritmo de división de los mismos

Embriones generados	n	Media	DT	Mín	P25	Mediana	P75	Máx	Total
Nº de embriones	193	4,6	3,2	1	2	4	6	19	887
Proporción de embriones de calidad A o B (%)	193	56,9	34,1	0,0	33,3	62,5	85,7	100	
Calidad A	193	0,6	1,2	0	0	0	1	11	111
Calidad B	193	2,1	1,8	0	1	2	3	8	400
Calidad C	193	1,5	1,6	0	0	1	2	10	289
Calidad D	193	0,5	0,9	0	0	0	1	5	87
Velocidad de división normal	193	3,4	2,6	0	1	3	5	16	649
Velocidad de división lenta	193	0,9	1,4	0	0	0	2	12	182
Velocidad de división rápida	193	0,1	0,4	0	0	0	0	4	17

**Tabla 44.** Embiones transferibles tras su evaluación

Embriones transferibles	n	Media	DT	Mín	P25	Mediana	P75	Máx	Total
Nº de embriones	192	4,6	3,2	1	2	4	6	19	886
Proporción de embriones de calidad A o B (%)	192	56,7	34,0	0,0	33,3	62,5	85,7	100	
Calidad A	192	0,6	1,2	0	0	0	1	11	111
Calidad B	192	2,1	1,8	0	1	2	3	8	399
Calidad C	192	1,5	1,6	0	0	1	2	10	289
Calidad D	192	0,5	0,9	0	0	0	1	5	87
Velocidad de división normal	192	3,4	2,5	0	1	3	5	16	649
Velocidad de división lenta	192	0,9	1,4	0	0	0	2	12	182
Velocidad de división rápida	192	0,1	0,4	0	0	0	0	4	17

**Tabla 45.** Número y calidades de embriones transferidos en fresco y clularidad de los mismos

<b>Embriones transferidos fresco</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DT</b>	<b>Mín</b>	<b>P25</b>	<b>Mediana</b>	<b>P75</b>	<b>Máx</b>	<b>Total</b>
Nº de embriones transferidos fresco	180	1,8	0,4	1	2	2	2	3	333
Calidad A	180	0,4	0,6	0	0	0	1	2	71
Calidad B	180	1,0	0,8	0	0	1	2	2	188
Calidad C	180	0,4	0,6	0	0	0	1	2	65
Calidad D	180	0,1	0,3	0	0	0	0	2	9
Nº de células de los embriones transferidos	180	11,5	5,0	2	8	12	16	32	2078
Promedio de células por embrión	180	6,2	2,2	2	4	7	8	16	1122

**Tabla 46.** Resultados de gestaciones por transferencia realizada

<b>Gestaciones por transferencia</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Transferencia de embriones tras FIV-ICSI	180	
Transferencia de embrión en día 3	118	65,6
Transferencia de embrión en día 2	61	33,9
Embarazo bioquímico	60	33,3
Embarazo clínico	52	28,9
Aborto	12	6,7
Embarazo ectópico/heterotópico	2	1,1

**Tabla 47.** Resultados de gestaciones por transferencia y resultados obstétricos por parto

<b>Partos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Número de partos y % por transferencia	40	22,2
Con alguna patología obstétrica materna	17	42,5
Con alguna patología obstétrica fetal	22	55,0
Partos inducidos	14	35,0
Cesáreas	14	35,0
Partos de múltiples nacidos	12	30,0
Edad gestacional < 37 semanas	15	37,5
Partos con alguno de los nacidos con peso < 2500 g	13	32,5
Partos con nacidos con alteración o secuelas	8	20,0

**Tabla 48.** Resultados de recién nacidos de FIV/ICSI

<b>Nacidos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Número de nacidos	52	
Nacidos con peso < 2500 g	24	46,2
Nacidos con anomalías o secuelas	8	15,4

Se logró establecer una cohorte de 52 RN para seguimiento y estudios posteriores.

A continuación se exponen las tablas con los indicadores de los resultados obtenidos.

**Tabla 49.** Indicadores de resultados de madurez ovocitaria por punción realizada

<b>Indicadores de resultados de ovocitos</b>	<b>n</b>	<b>Numerador</b>	<b>Denominador</b>	<b>Valor</b>
Ovocitos totales/foliculos desarrollados	205	1.865	2.386	78,2%
Ovocitos totales/foliculos puncionados	205	1.861	2.418	77,0%
Tasa de ovocitos (MII) maduros recuperados	202	1.459	2.403	60,7%
Tasa de inmadurez ovocitaria	202	377	2.403	15,7%
Ratio de madurez ovocitaria	202	1.459	377	3,87
Tasa de inmadurez ovocitaria	202	377	1.459	0,26

**Tabla 50.** Indicadores de calidad de fecundación de ovocitos tras su evaluación

<b>Indicadores de fecundación</b>	<b>n</b>	<b>Numerador</b>	<b>Denominador</b>	<b>Valor</b>
Tasa bruta de fecundacion	202	887	1.620	54,8%
Tasa de fecundacion ICSI	202	887	1.595	55,6%
Tasa de fecundación FIV	5	9	25	36,0%
Tasa bruta de fecundación de embriones óptimos	202	511	1.620	31,5%
Tasa de fecundación de embriones optimos de MII	202	511	1.459	35,0%
Tasa bruta de fecundación de embriones subóptimos	202	376	1.620	23,2%
Tasa de fecundación de embriones subóptimos de MII	202	376	1.459	25,8%
Tasa bruta de ovocitos no fecundados	202	637	1.620	39,3%
Tasa de MII no fecundados	202	637	1.459	43,7%
Tasa de fecundacion anomala de MII	202	120	1.459	8,2%

**Tabla 51.** Indicadores de calidad de los embreiones generados en el proceso

<b>Indicadores de calidad embrionaria</b>	<b>n</b>	<b>Numerador</b>	<b>Denominador</b>	<b>Valor</b>
Ratio calidad embrionaria	193	511	376	1,36
Tasa bruta de embreiones bloqueados	202	53	1.620	3,3%
Tasa de embriones bloqueados de MII	202	53	1.459	3,6%
Tasa bruta de embriones con velocidad de division normal	202	649	1.620	40,1%
Tasa bruta de embriones con velocidad lenta	202	182	1.620	11,2%
Tasa bruta de embriones rapidos	202	17	1.620	1,0%
Tasa de velocidad normal de embriones de MII	202	649	848	76,5%
Tasa de velocidad lenta de embriones de MII	202	182	848	21,5%
Tasa de velocidad rapida	202	17	848	2,0%
Ratio embriones lentos	202	182	666	0,27
Ratio embriones rapidos	202	17	831	0,02

**Tabla 52.** Indicadores de calidad de embriones transferidos en fresco

<b>Indicadores de transferencia</b>	<b>n</b>	<b>Numerador</b>	<b>Denominador</b>	<b>Valor</b>
Media de celulas del total de embriones transferidos	180	2.078	180	11,54
Proporcion embriones transferidos calidad optima	180	259	333	77,8%
Proporcion embriones transferidos calidad suboptima	180	74	333	22,2%

**Tabla 53.** Indicadores de evolución y resultados de la gestación

<b>Indicadores de evolución y resultados de gestación</b>	<b>n</b>	<b>Numerador</b>	<b>Denominador</b>	<b>Valor</b>
Tasa de embarazo bioquimico por transferencia	180	60	180	33,3%
Tasa de embarazo clinico por transferencia	180	52	180	28,9%
Tasa de aborto por transferencia	180	12	180	6,7%
Ratio de abortos por bhcg>5	60	12	60	20,0%
Tasa de partos con al menos 1 rn vivo	180	40	180	22,2%
Tasa de recién nacidos vivos por transferencia	180	52	180	28,9%
Tasa de gemelares por transfer	180	24	180	13,3%
Tasa de rn bajo peso	40	13	40	32,5%
Tasa de prematuridad (<37 semanas)	40	15	40	37,5%



## 4.2. ESTUDIO ANALÍTICO O INFERENCIAL

Para este estudio utilizamos el test de *Spearman* para valorar la posible correlación entre variables continuas sin distribución normal y la intensidad de su asociación mediante el coeficiente *Rho*.

Para calcular la posible asociación entre dos variables cualitativas usamos las tablas de contingencia para su descripción y el test Chi-Cuadrado para valorar su independencia/homogeneidad.

### A. Correlaciones entre metales pesados de pelo y líquido folicular

Tras confirmar que las variables no seguían una distribución normal, dada la gran dispersión de sus valores, se estudió la posible relación entre las concentraciones de los 4 metales pesados (As, Cd; Hg y Pb) analizados en cada muestra de líquido folicular y pelo. Para ello, cruzamos los datos de todas las concentraciones halladas en cada una de las 2 matrices biológicas. El análisis estadístico lo realizamos empleando el coeficiente de correlación ordinal de *Spearman* y una prueba de significación bilateral, excluyendo los casos con valores desconocidos o no detectados.

Encontramos las siguientes correlaciones estadísticamente significativas con  $p < 0.05$ :

✓ Del mismo metal entre líquido folicular (LF) y pelo solo sucedió con el **arsénico** con un coeficiente *Rho* de 0,327.

✓ De distintos metales entre líquido folicular y pelo sucedió con Hg en LF y As en pelo con un *Rho* de 0,372. También existió correlación entre Pb en LF y As en pelo con *Rho* 0.352.

✓ De distintos metales entre sí en LF sucedió con el As que se correlacionó con el Cd, Hg y Pb con *Rho* 0,506, 0,392 y 0,183 respectivamente. También se correlacionó el Hg y el Pb en LF con *Rho* 0,352.

✓ De distintos metales entre sí en pelo se correlacionó As y Cd con *Rho* 0,164 y Cd y Pb con *Rho* 0,611.

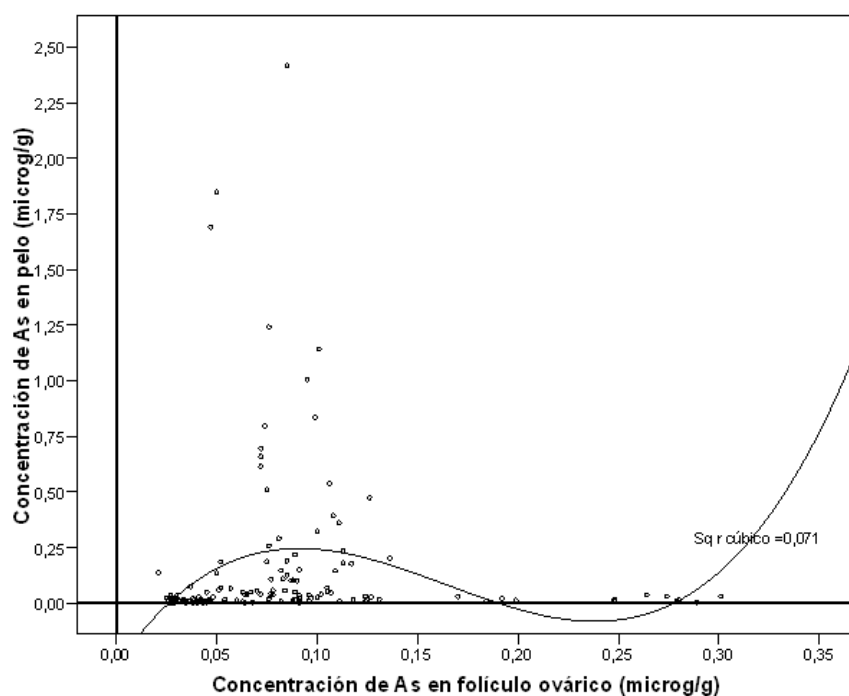
La asociación más fuerte encontrada fue de As y Cd en LF y de Cd y Pb en pelo (Tabla 54).

Realizamos un modelo cúbico para representar el gráfico de la nube de puntos para expresar la relación de la concentración de As entre pelo y líquido folicular de una forma más expresiva (Fig. 53).

De este modo queda cumplido el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral.

**Tabla 54.** Correlaciones (coeficiente Rho de Spearman, y valor de p) entre las concentraciones de los metales en líquido folicular ovárico y pelo. LF: líquido folicular

	As LF (microg/g)	Cd LF (nanog/g)	Hg LF (microg/g)	Pb LF (microg/g)	As pelo (microg/g)	Cd pelo (nanog/g)	Hg pelo (microg/g)	Pb pelo (microg/g)
As LF (microg/g)	-	<b>0,506</b>	<b>0,392</b>	<b>0,183</b>	<b>0,327</b>	0,013	0,123	-0,106
	-	0,0005	0,0005	0,018	0,0005	0,854	0,087	0,142
Cd LF (nanog/g)		-	0,159	0,088	-0,102	-0,030	0,142	-0,006
		-	0,065	0,301	0,290	0,716	0,072	0,942
Hg LF (microg/g)			-	<b>0,352</b>	<b>0,372</b>	-0,019	0,125	-0,053
			-	0,0005	0,0005	0,807	0,106	0,492
Pb LF (microg/g)				-	<b>0,342</b>	0,015	-0,044	-0,087
				-	0,0005	0,851	0,576	0,268
As pelo (microg/g)					-	<b>0,164</b>	0,113	0,146
					-	0,050	0,179	0,082
Cd pelo (nanog/g)						-	-0,024	<b>0,611</b>
						-	0,736	0,0005
Hg pelo (microg/g)							-	0,109
							-	0,127
Pb pelo (microg/g)								-
								-



**Figura 53.** Nube de puntos de correlación entre concentración de AS en LF y pelo (modelo cúbico).

## **B. Variables sociodemográficas con antecedentes obstétricos y metales pesados**

Analizamos la edad en cuartiles, el IMC en cuartiles, el nivel académico dicotómico, antecedentes de embarazo previo y aborto, también dicotómicos para comprobar si existe algún tipo de asociación con los metales pesados analizados en LF y pelo categorizados también en cuartiles. Realizamos las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (con la corrección de significación de Liellefors) y de Shapiro-Wilk, para posteriormente realizar las pruebas de homogeneidad de la varianza con el estadístico de Levene y por fin poder aplicar el test Chi-Cuadrado.

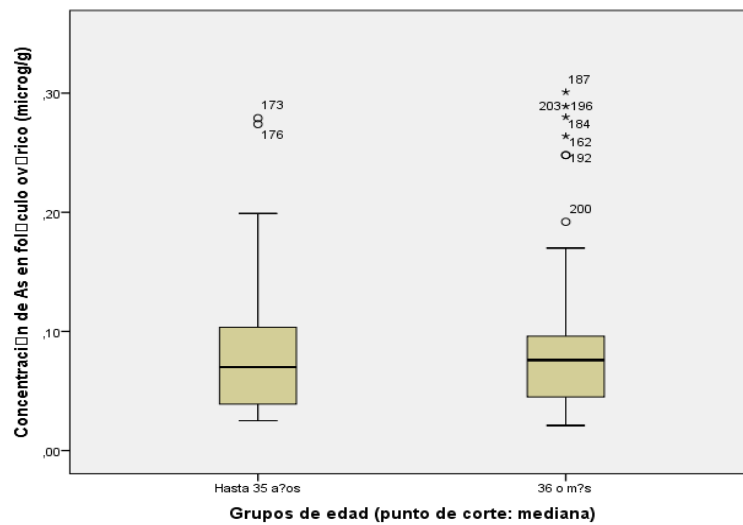
Encontramos *diferencias significativas* en las siguientes correlaciones:

✓ **Edad y As en líquido folicular:** encontramos diferencia estadísticamente significativa con  $p = 0,026$  y 3 grados de libertad (gl), así pues, observando que por encima de la mediana o P50 se acumulaban más casos por encima de los 35 años. Por tanto, en el intervalo de la concentración de As en LF 0,0616-0,0910  $\mu\text{g/g}$  debería haber un punto de corte que hace que la edad pudiera influir respecto a la acumulación de este metal en el LF (Tabla 55) (Fig. 54).

**Tabla 55.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles de As en LF y edad de la mujer

Tabla cruzada					
			Grupos de edad (punto de corte mediana)		
			≤35 años	≥ 36 años	Total
Cuartiles según la concentración de As en LF (microg/g)	Hasta 0´0380	Recuento	30	19	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	61,2%	39,8%	100,0%
	De 0´0389 a 0´0615	Recuento	30	20	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	60,0%	40,0%	100,0%
	De 0´0616 a 0´0910	Recuento	20	34	54
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	37,0%	63,0%	100,0%
	Mayor de 0´0911	Recuento	38	17	45
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	62,2%	37,8%	100,0%
	Total	Recuento	108	90	198
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	54,5%	45,5%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	9,228 <sup>a</sup>	3	,026		
Razón de verosimilitud	9,253	3	,026		
Asociación lineal por lineal	,572	1	,049		
N de casos válidos	198				

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 20,45.



..Figura 54. Diagrama de cajas entre concentración de As en LF y edad mujer.

✓ Antecedente de *aborto* y *Cd* en *LF*: existían diferencias significativas con  $p = 0,043$  (3 gl) con correlación inversa, manteniéndose la diferencia en todos los cuartiles de la cocenntración de Cd según el aumento de la concentración de Cd en LF en todos los cuartiles a favor de las que no tenían antecedentes de aborto. (Tabla 56) (Fig. 55).

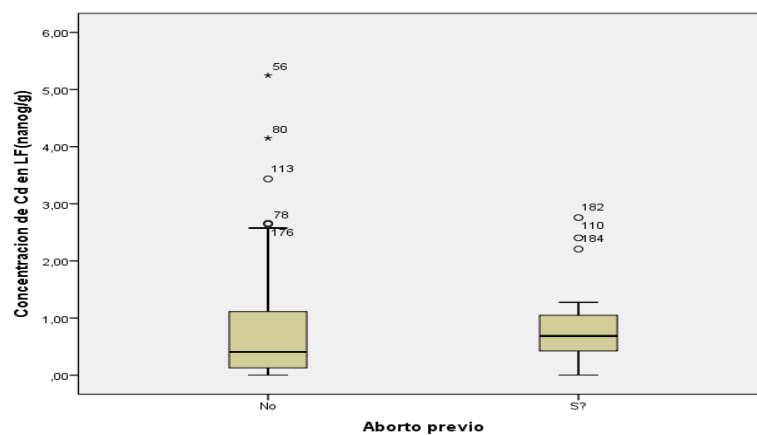


Figura 55. Diagrama de cajas entre concentración de Cd en LF y aborto previo

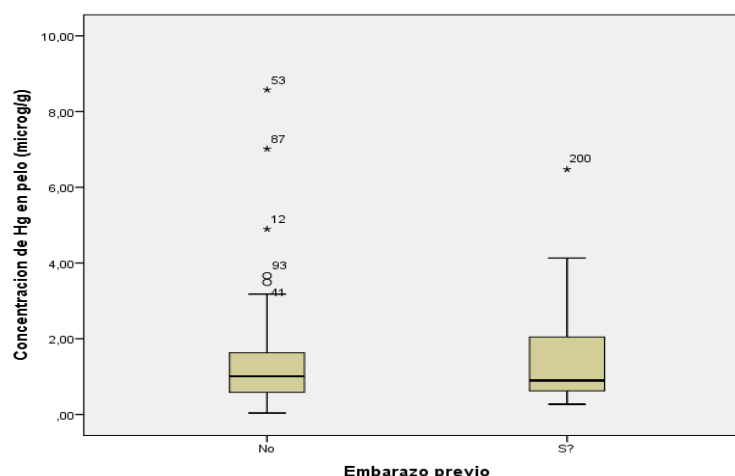
**Tabla 56.** Contingencia y Chi-cuadrado entre concentración de Cd en LF y aborto previo

Tabla cruzada					
		Aborto previo			
		No	SI	Total	
Cuartiles según la concentración de Cd en LF (nanog/g)	Hasta 0´1405	Recuento	37	2	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	94,9%	5,1%	100,0%
	De 0´1406 a 0´4920	Recuento	33	7	40
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	82,5%	17,5%	100,0%
	De 0´4921 a 1´1075	Recuento	28	11	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	71,8%	28,2%	100,0%
	Mayor de 1´1076	Recuento	34	5	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	87,2%	12,8%	100,0%
Total	Recuento	132	25	157	
	% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	84,1%	15,9%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,144 <sup>a</sup>	3	,043
Razón de verosimilitud	8,511	3	,037
Asociación lineal por lineal	1,646	1	,200
N de casos válidos	157		

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,21.

✓ Concentración de *Hg* en *pelo* y *antecedente de embarazo*: encontramos diferencia con  $p = 0,034$  (3 gl), así, según aumentaba la concentración de Hg en pelo disminuía el antecedente de embarazo previo (correlación inversa) (Tabla 57) (Fig. 56).



**Figura 56.** Diagrama de cajas entre la concentración de Hg en pelo y antecedente de gestación.

**Tabla 57.** Contingencia de la concentración de Hg en pelo y antecedente de gestación

Tabla cruzada					
			Embarazo previo		
			No	SÍ	Total
Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	Hasta 0´5640	Recuento	40	10	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	80,0%	20,0%	100,0%
	De 0´5641 a 0´9200	Recuento	33	17	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	66,0%	34,0%	100,0%
	De 0´9201 a 1´5970	Recuento	45	5	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	90,0%	10,0%	100,0%
	Mayor de 1´5971	Recuento	37	12	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	75,5%	24,5%	100,0%
	Total	Recuento	155	44	199
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	77,9%	22,1%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
			Significación asintótica (bilateral)		
	Valor	gl			
Chi-cuadrado de Pearson	8,653 <sup>a</sup>	3	,034		
Razón de verosimilitud	9,060	3	,029		
Asociación lineal por lineal	,166	1	,684		
N de casos válidos	199				

a. 4 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 10,83.

### C. Antecedentes generales y ginecológicos, y metales en LF y pelo

Como en el apartado anterior estudiamos, utilizando los mismos estadísticos, analizamos las variables transformando en dicotómicas las que no lo estaban y buscamos asociaciones con la concentración de los metales pesados en LF y pelo distribuidos en cuartiles. Las variables analizadas fueron: comorbilidades, antecedentes de alergia, endometriosis, ausencia o alteración del patrón ovulador, SOP, baja respuesta ovárica, laparoscopia o laparotomía previa, histeroscopia o legrado previo, FSH basal durante último año, cociente LH/FSH alterado, estradiol basal durante último año PRL basal durante último año, TSH basal durante último año, protocolo de estimulación ovárica, ajuste de la dosis de FSH durante el ciclo ajuste de la dosis de LH durante el ciclo, empleo de adyuvantes en estimulación ovárica, realización de ciclo previo, cancelación de ciclo previo.

Encontramos *diferencias significativas* en las siguientes asociaciones:

✓ En la correlación entre las variables *comorbilidad*, *SOP* y *As* en *LF* obtuvimos una  $p = 0,063$  y  $0,061$  con 3 gl respectivamente, que quizá podría alcanzar el nivel de significación con un mayor número de casos.

✓ Entre *As* en *LF* y *FSH basal* en el último año existió correlación inversa, aumentando los casos de  $FSH > 12$  mUI/mL por debajo del P25 de la concentración de *As* en *LF* con  $p = 0.031$  (3 gl). En cambio, en pelo la diferencia fue no significativa. (Tabla 58) (Fig. 57). Este hallazgo habría que confirmarlo aumentando el tamaño muestral, ya que sólo existieron 5 casos con *FSH* patológica.

**Tabla 58.** Cotingencia y Chi-cuadrado entre entre concentración *As* en *LF* y *FSH* basal en último año

Tabla cruzada						
			FSH basal último año		Total	
			Normal	FSH ( $\geq 12$ mU/ml)		
Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	Hasta 0'0380	Recuento	45	4	49	
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	91,8%	8,2%	100,0%	
	De 0'0389 a 0'0615	Recuento	50	0	50	
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	100,0%	0,0%	100,0%	
	De 0'0616 a 0'0910	Recuento	53	1	54	
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	98,1%	1,9%	100,0%	
	Mayor de 0'0911	Recuento	45	0	45	
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	100,0%	0,0%	100,0%	
	Total	Recuento		193	5	198
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)		97,5%	2,5%	100,0%

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,888 <sup>a</sup>	3	,031
Razón de verosimilitud	8,993	3	,029
Asociación lineal por lineal	4,963	1	,026
N de casos válidos	198		

a. 4 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,14.



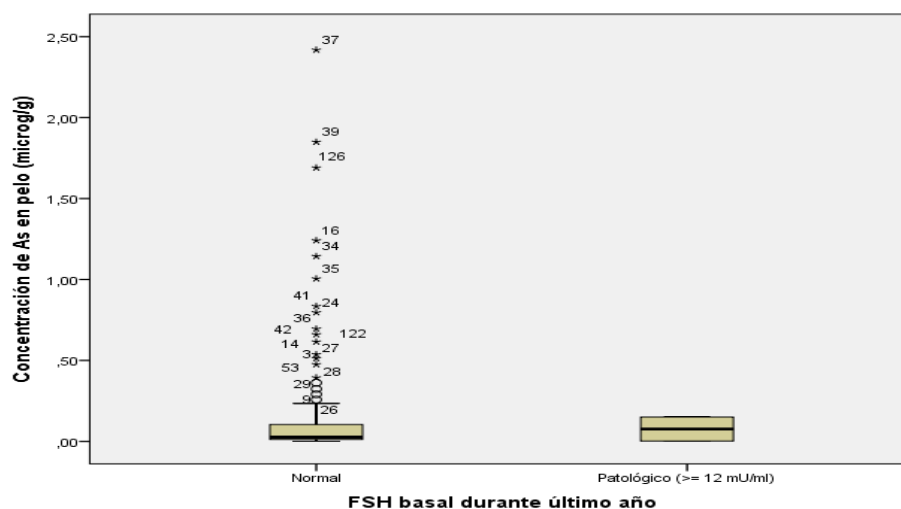


Figura 57. Diagrama de cajas entre la correlación de As en LF y FSH basal último año.

✓ Entre la concentración de *As* en *pelo* y ausencia o alteración del *patrón ovulador* existió una correlación inversa con  $p = 0,046$  (3 gl), acumulándose más casos por debajo del P50 de la concentración de As en LF (Tabla 59) (Fig. 58).

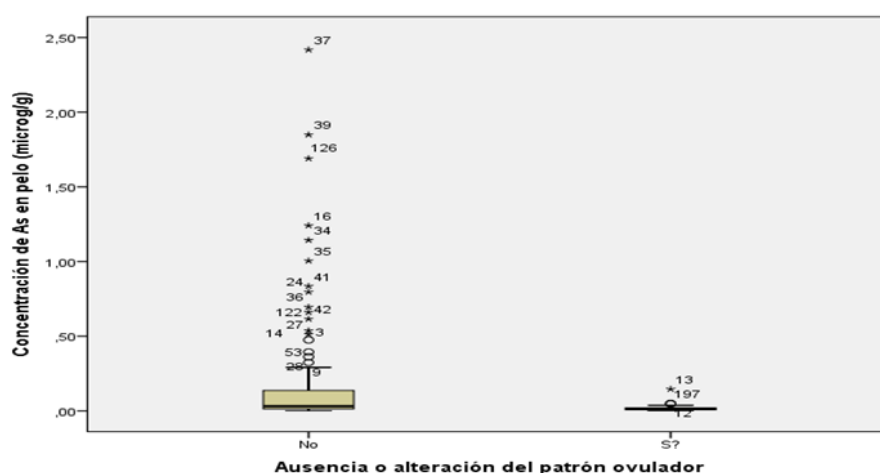


Figura 58. Diagrama de cajas entre concentración As en pelo y ausencia o alteración ovulación

**Tabla 59.** Contingencia y Chi-cuadrado entre la concentración de As en pelo y la ausencia o alteración del patrón ovulador

Tabla cruzada					
			Ausencia o alteración del patrón ovulador		Total
			No	Sí	
Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	Hasta 0'0110	Recuento	29	7	36
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	80,6%	19,4%	100,0%
	De 0'0111 a 0'0240	Recuento	27	9	36
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	75,0%	25,0%	100,0%
	De 0'0241 a 0'1040	Recuento	32	4	36
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	88,9%	11,1%	100,0%
	Mayor de 0'1041	Recuento	34	1	35
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	97,1%	2,9%	100,0%
	Total		Recuento	122	21
% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)			85,3%	14,7%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,983 <sup>a</sup>	3	<b>,046</b>
Razón de verosimilitud	9,169	3	,027
Asociación lineal por lineal	5,674	1	,017
N de casos válidos	143		

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 5,14.

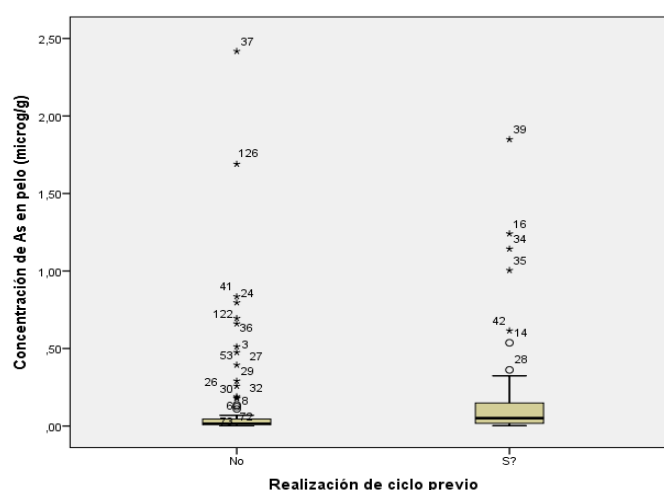
✓ Entre *As en pelo* y la realización de un *ciclo previo de FIV* obtuvimos una diferencia altamente significativa con  $p = 0,001$  (3 gl), aumentando los casos de realización de ciclo previo cuando la concentración de As en pelo se encontraba por encima del P50. **Podría Investigarse como marcador de mal pronóstico.** (Tabla 60) (Fig 59).

**Tabla 60.** Contingencia y Chi-cuadrado entre As en pelo y realización de ciclo previo

Tabla cruzada			Realización de ciclo previo		
			No	SÍ	Total
Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	Hasta 0'0110	Recuento	29	7	36
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	80,6%	19,4%	100,0%
	De 0'0111 a 0'0240	Recuento	26	10	36
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	72,2%	27,8%	100,0%
	De 0'0241 a 0'1040	Recuento	15	21	36
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	41,7%	58,3%	100,0%
Mayor de 0'1041		Recuento	17	18	35
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	48,6%	51,4%	100,0%
Total		Recuento	87	56	143
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en pelo (microg/g)	60,8%	39,2%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado de As pelo y ciclo FIV previo			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,597 <sup>a</sup>	3	,001
Razón de verosimilitud	16,064	3	,001
Asociación lineal por lineal	11,964	1	,001
N de casos válidos	143		

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 13,71.



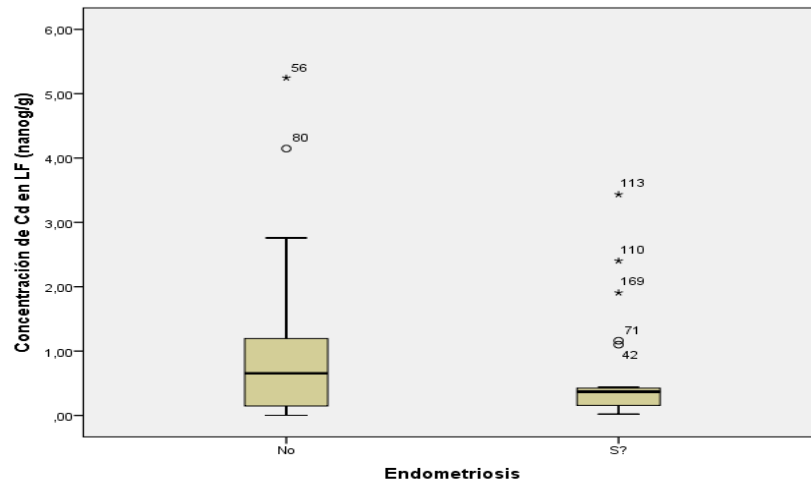
**Figura 59.** Diagrama de cajas entre concentración de As en pelo y realización de ciclo previo.

✓ Entre *endometriosis* y *Cd* en *LF* encontramos una diferencia altamente significativa de  $p = 0,001$  (3 gl) con correlación inversa, acumulándose la mayoría de los casos con esta patología por debajo del P50 de la concentración de *Cd* en *LF*. (Tabla 61) (Fig. 60).

**Tabla 61.** Contingencia y Chi-cuadrado entre *Cd* en *LF* y endometriosis

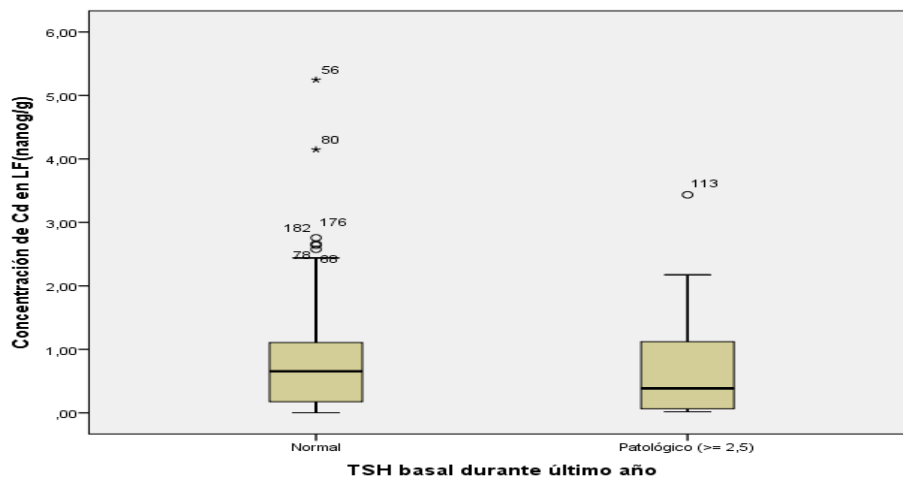
Tabla cruzada					
Cuartiles según la concentración de <i>Cd</i> en <i>LF</i> (nanog/g)			Endometriosis		
			No	SI	Total
Hasta 0´1405	Recuento		34	5	39
	% dentro de Cuartiles según la concentración de <i>Cd</i> en folículo (nanog/g)		87,2%	12,8%	100,0%
De 0´1406 a 0´4920	Recuento		26	14	40
	% dentro de Cuartiles según la concentración de <i>Cd</i> en folículo (nanog/g)		65,0%	35,0%	100,0%
De 0´4921 a 1´1075	Recuento		38	1	39
	% dentro de Cuartiles según la concentración de <i>Cd</i> en folículo (nanog/g)		97,4%	2,6%	100,0%
Mayor de 1´1076	Recuento		34	5	39
	% dentro de Cuartiles según la concentración de <i>Cd</i> en folículo (nanog/g)		87,2%	12,8%	100,0%
Total	Recuento		132	25	157
	% dentro de Cuartiles según la concentración de <i>Cd</i> en folículo (nanog/g)		84,1%	15,9%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	16,633 <sup>a</sup>	3	,001		
Razón de verosimilitud	16,819	3	,001		
Asociación lineal por lineal	1,567	1	,211		
N de casos válidos	157				

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,21.



**Figura 60.** Diagrama de cajas entre Cd en LF y endometriosis.

✓ Entre el *Cd* en *LF* y la *TSH* > 2,5 mUI/mL encontramos diferencias significativas ( $p = 0,037$ , 3 gl), con correlación inversa, acumulándose el doble de casos por debajo del P50 de la concentración de Cd en LF (Tabla 62) (Fig 61).



**Figura 61.** Diagrama de cajas entre Cd en LF y TSH basal último año.

**Tabla 62.** Contingencia y Chi-cuadrado entre los cuartiles de Cd en LF y TSH basal en último año

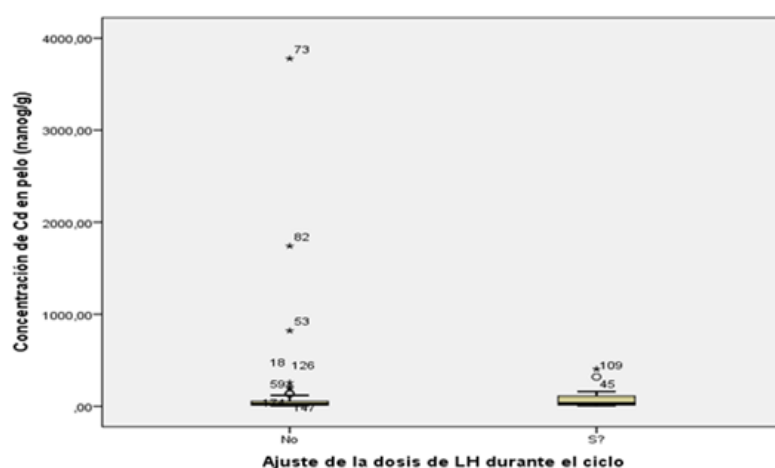
Tabla cruzada					
			TSH basal durante último año		
			Normal	Alterada (>= 2,5)	Total
Cuartiles según la concentración de Cd en foliculo (nanog/g)	Hasta 0'1405	Recuento	25	14	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en foliculo (nanog/g)	64,1%	35,9%	100,0%
	De 0'1406 a 0'4920	Recuento	26	14	40
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en foliculo (nanog/g)	65,0%	35,0%	100,0%
	De 0'4921 a 1'1075	Recuento	35	4	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en foliculo (nanog/g)	89,7%	10,3%	100,0%
	Mayor de 1'1076	Recuento	29	10	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en foliculo (nanog/g)	74,4%	25,6%	100,0%
	Total	Recuento	115	42	157
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en foliculo (nanog/g)	73,2%	26,8%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	8,494	3	,037		
Razón de verosimilitud	9,450	3	,024		
Asociación lineal por lineal	3,067	1	,080		
N de casos válidos	157				

✓ Entre el Cd en pelo y el ajuste de dosis de LH encontramos diferencias significativas ( $p = 0.013$ ), (3 gl), observándose que hubo que ajustar la dosis de LH en el 57,2% de las pacientes con Cd en pelo por encima del P50, frente a las que no fue necesario hacerlo, en las que no hubo prácticamente diferencias en ninguno de los cuartiles de la concentración de Cd en pelo (Tabla 63) (Fig 62).

**Tabla 63.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles de Cd en pelo y ajuste de dosis de LH

Tabla cruzada					
			Ajuste de la dosis de LH durante el ciclo		Total
			No	Sí	
Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	Hasta 12'4225	Recuento	43	6	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	87,8%	12,2%	100,0%
	De 12'4226 a 26'9510	Recuento	39	11	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	78,0%	22,0%	100,0%
	De 26'9511 a 62'5325	Recuento	40	9	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	81,6%	18,4%	100,0%
	Mayor de 62'5326	Recuento	30	19	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	61,2%	38,8%	100,0%
	Total	Recuento	152	45	197
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	77,2%	22,8%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,757 <sup>a</sup>	3	,013
Razón de verosimilitud	10,422	3	,015
Asociación lineal por lineal	7,975	1	,005
N de casos válidos	197		



**Figura 62.** Diagrama de cajas entre concentración de Cd en pelo y ajuste de dosis de LH.

✓ Entre el *Hg* en *LF* y ausencia o alteración del *patrón ovulador* encontramos correlación inversa con  $p = 0,011$  (3 gl), donde más del 80% de los casos se encontraban por debajo del P50 de la concentración de Hg en LF (Tabla 64) (Fig. 63).

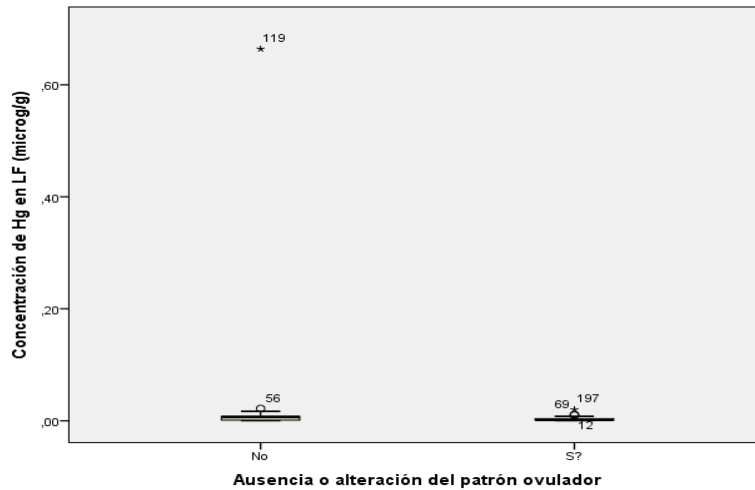
**Tabla 64.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles de Hg en LF y ausencia o alteración de la ovulación

Tabla cruzada					
		Ausencia o alteración del patrón ovulador			
		No	Sí	Total	
Cuartiles según la concentración de Hg en LF (microg/g)	Hasta 0´010	Recuento	40	13	53
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	75,5%	24,5%	100,0%
	De 0´011 a 0´070	Recuento	49	4	53
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	92,5%	7,5%	100,0%
	De 0´071 a 0´080	Recuento	30	1	31
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	96,8%	3,2%	100,0%
	Mayor de 0´081	Recuento	31	3	34
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	91,2%	8,8%	100,0%
	Total	Recuento	150	21	171
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	87,7%	12,3%	100,0%

Pruebas de Chi-cuadrado			
	Valor	gl	significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,219 <sup>a</sup>	3	,011
Razón de verosimilitud	10,845	3	,013
Asociación lineal por lineal	6,032	1	,014
N de casos válidos	171		

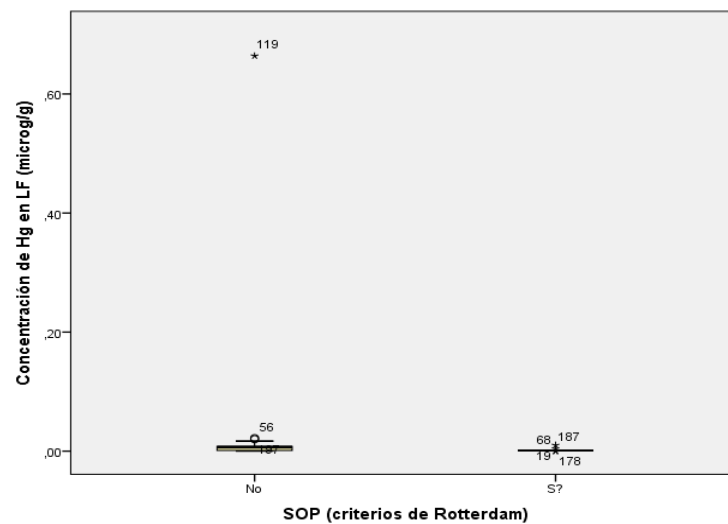
a.: 0 casillas en blanco.





**Figura 63.** Diagrama de cajas entre Hg en LF y ausencia o alteración de la ovulación.

✓ Entre **Hg** en **LF** y **SOP**, también encontramos correlación inversa con  $p = 0,018$  (3 gl), donde más del 80% de los casos se encontraban por debajo del P50 de la concentración de Hg en LF (Tabla 65) (Fig 64).



**Figura 64.** Diagrama de cajas entre Hg en LF y SOP

**Tabla 65.** Contingencia y chi-cuadrado entre cuartiles de concentración de Hg en LF y SOP

Tabla cruzada					
		SOP (criterios de Rotterdam)		Total	
		No	SI		
Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	Hasta 0'010	Recuento	46	7	53
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	86,8%	13,2%	100,0%
	De 0'011 a 0'070	Recuento	52	1	53
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	98,1%	1,9%	100,0%
	De 0'071 a 0'080	Recuento	31	0	31
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	100,0%	0,0%	100,0%
	Mayor de 0'081	Recuento	33	1	34
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	97,1%	2,9%	100,0%
	Total	Recuento	162	9	171
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	94,7%	5,3%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica bilateral		
Chi-cuadrado de Pearson	10,010 <sup>a</sup>	3	,018		
Razón de verosimilitud	10,200	3	,017		
Asociación lineal por lineal	5,289	1	,021		
N de casos válidos	171				

a. 4 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,63.

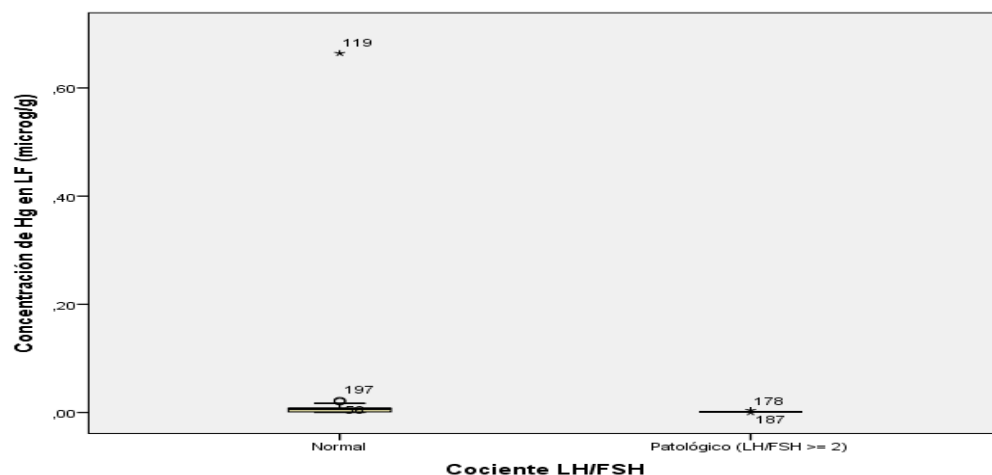
✓ Entre el **Hg** en **LF** y cociente **LH/FSH** > 2, también encontramos correlación inversa con  $p = 0,041$  (3 gl), donde todos los casos se encontraban por debajo del P50 de la concentración de Hg en LF (Tabla 66) (Fig 65).

Estos hallazgos nos hacen pensar que el Hg podría tener algún tipo de relación con las alteraciones ovulatorias de la mujer, ya que existe correlación inversa en las 3 variables estudiadas relacionadas con este tipo de patología.

**Tabla 66.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles de concentración de Hg en LF y cociente LH/FSH alterado

Tabla cruzada					
		Cociente LH/FSH			
		Normal	Patológico (LH/FSH >= 2)	Total	
Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	Hasta 0'010	Recuento	48	5	53
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	90,6%	9,4%	100,0%
	De 0'011 a 0'070	Recuento	52	1	53
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	98,1%	1,9%	100,0%
	De 0'071 a 0'080	Recuento	31	0	31
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	100,0%	0,0%	100,0%
	Mayor de 0'081	Recuento	34	0	34
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	100,0%	0,0%	100,0%
	Total	Recuento	165	6	171
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en folículo (microg/g)	96,5%	3,5%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	8,271 <sup>a</sup>	3	,041		
Razón de verosimilitud	8,943	3	,030		
Asociación lineal por lineal	6,187	1	,013		
N de casos válidos	171				

a. 4 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,09.



**Figura 65.** Diagrama de cajas entre Hg en LF y alteración del cociente LH/FSH

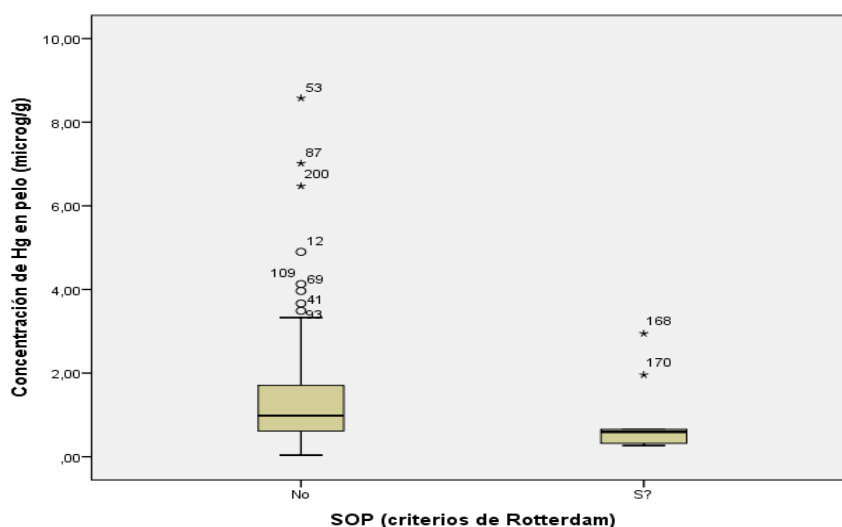
✓ Entre el **Hg** en **pelo** y ausencia o alteración del **patrón ovulador** nos encontramos con un valor de  $p = 0,052$  (3 gl), muy cercano al nivel de significación estadística, que quizá se hubiese alcanzado con un aumento del tamaño menstrual.

✓ Entre el **Hg** en **pelo** y **SOP**, también encontramos correlación inversa con  $p = 0,027$  (3 gl), donde más del 80% de los casos se encontraban por debajo del P50 de la concentración de Hg en pelo (Tabla 67) (Fig. 66).

**Tabla 67.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles de concentración Hg en pelo y SOP

Tabla cruzada					
			SOP (criterios de Rotterdam)		
			No	SÍ	Total
Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	Hasta 0'5640	Recuento	43	7	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	86,0%	14,0%	100,0%
	De 0'5641 a 0'9200	Recuento	47	3	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	94,0%	6,0%	100,0%
	De 0'9201 a 1'5970	Recuento	50	0	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	100,0%	0,0%	100,0%
	Mayor de 1'5971	Recuento	47	2	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	95,9%	4,1%	100,0%
	Total	Recuento	187	12	199
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Hg en pelo (microg/g)	94,0%	6,0%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	9,142 <sup>a</sup>	3	,027		
Razón de verosimilitud	10,758	3	,013		
Asociación lineal por lineal	5,626	1	,018		
N de casos válidos	199				

a. 4 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,95.



**Figura 66.** Diagrama de cajas entre concentración de Hg en pelo y SOP.

✓ Entre el Pb en LF y pelo no encontramos ninguna asociación con antecedentes.

#### D. Variables de exposición a tóxicos y metales pesados en LF y pelo

Como en el apartado anterior estudiamos, utilizando los mismos estadísticos, analizamos las variables transformando en dicotómicas las que no lo estaban y buscamos asociaciones con la concentración de los metales pesados en LF y pelo distribuidos en cuartiles. Las variables analizadas fueron: ejercicio físico durante la pasada semana, exposición al tabaco en cantidad de cigarrillos diarios antes y durante el ciclo de FIV, exposición al humo del tabaco, tabaco dicotómico (no expuesto / expuesto) consumo de café, exposición al alcohol en UBE antes y durante el ciclo, exposición a alcohol dicotómico (no expuesto / expuesto), exposición a tóxicos ambientales, riesgo de exposición laboral, consumo de agua mineral, ensalada en dieta, consumo semanal de huevos, grupos según consumo de carnes (raciones/mes), grupos según consumo de pescado (raciones/mes),

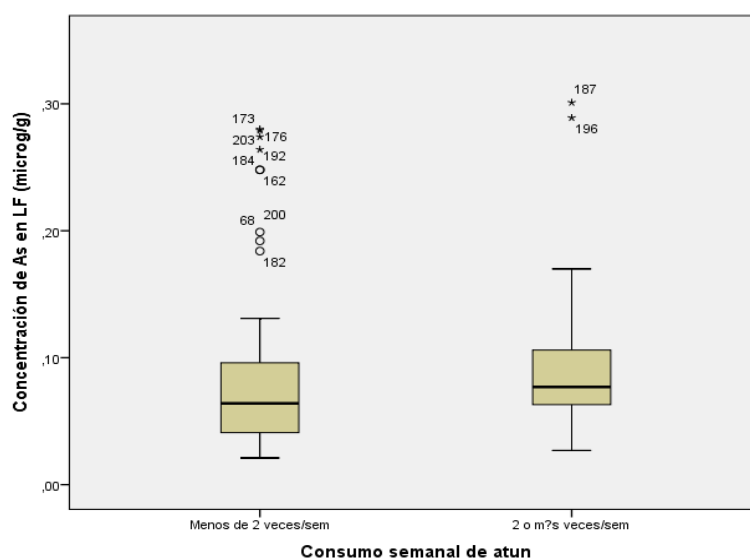
grupos según consumo de marisco (raciones/mes), consumo semanal de atún y consumo semanal de conservas.

Encontramos las siguientes *asociaciones estadísticamente significativas*:

✓ Entre la concentración de *As* en *LF* dividida en cuartiles y el consumo de *atún* dividido en menos o más de 2 raciones semanales (Tabla 68) encontramos correlación positiva con  $p = 0,005$ , encontrándose la mayoría de los casos por encima del P50 de la concentración de *As* en *LF*. Este es un *hallazgo novedoso* donde no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica que lo haya estudiado (Tabla 69) (Fig. 67).

**Tabla 68.** Consumo de atún dicotomizado

Consumo de atún	n	%
Menos de 2 veces/sem	129	62,9
2 o más veces/sem	76	37,1
Total	205	100,0



**Figura 67.** Diagrama de cajas entre *As* en *LF* y consumo de atún

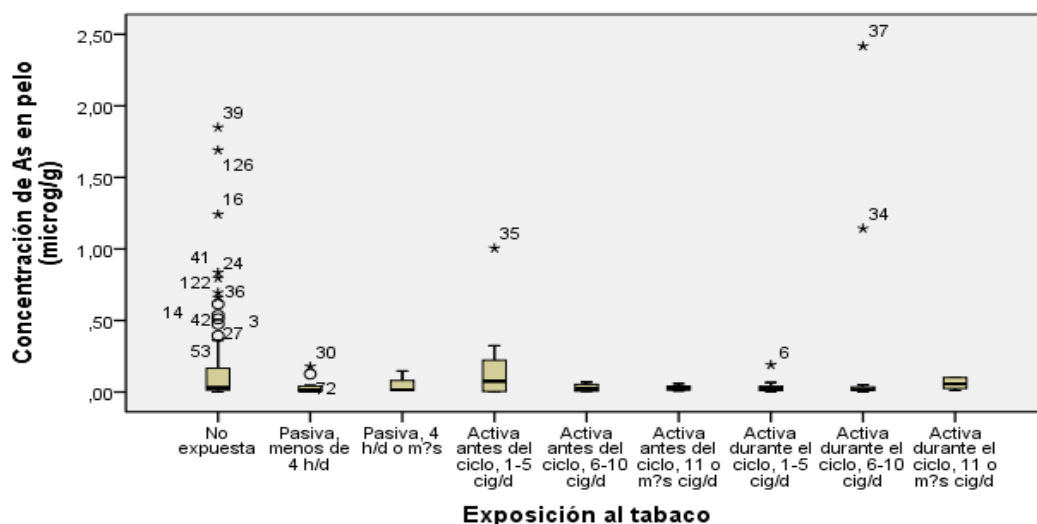
**Tabla 69.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles de As en LF y consumo de atún

Tabla cruzada					
		Consumo semanal de atún			
		Menos de 2 veces/sem	2 o más veces/sem	Total	
Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	Hasta 0'0380	Recuento	29	20	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	59,2%	40,8%	100,0%
	De 0'0389 a 0'0615	Recuento	42	8	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	84,0%	16,0%	100,0%
	De 0'0616 a 0'0910	Recuento	28	26	54
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	51,9%	48,1%	100,0%
	Mayor de 0'0911	Recuento	28	17	45
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	62,2%	37,8%	100,0%
	Total	Recuento	127	71	198
		% dentro de Cuartiles según la concentración de As en folículo (microg/g)	64,1%	35,9%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	12,715 <sup>a</sup>	3	,005		
Razón de verosimilitud	13,744	3	,003		
Asociación lineal por lineal	,642	1	,423		
N de casos válidos	198				

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 16,14.

✓ Entre consumo de *café* y As en *LF* obtuvimos una  $p = 0,088$  (3 gl), no muy lejana del nivel de significación, que quizá aumentando el tamaño muestral se hubiese alcanzado.

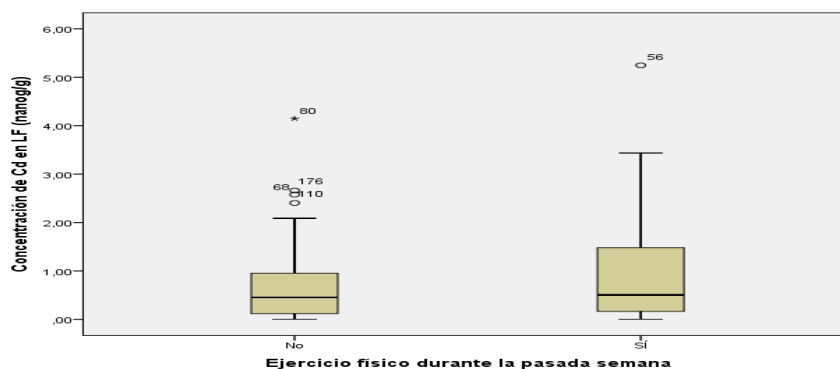
✓ Con el As en *pelo* y la exposición al *tabaco* encontramos una correlación inversa con  $p = 0,03$  (24 gl) con acúmulo de más casos en las no expuestas, fumadoras pasivas o de menos de 5 cigarrillos diarios, por debajo del P50 de la concentración de As en pelo (Fig. 68). Sin embargo, cuando transformamos la variable en dicotómica entre expuestas y no expuestas, no hallamos diferencias. Serían necesarios más estudios para verificar este hallazgo.



**Figura 68.** Diagrama de cajas entre concentracide As en pelo y exposición al tabaco

✓ En cuanto al *As en pelo* y *tóxicos ambientales* encontramos una  $p = 0,53$  (3 gl), al borde de la significación, que quizá hubiera resultado significativa aumentando el tamaño muestral.

✓ Entre *ejercicio físico* durante la semana previa a la punción y el *Cd* en *LF* encontramos una correlación inversa a favor de las que no lo hacían ( $p = 0,14$ , 3 gl), con un acúmulo de casos por debajo del P50 de la concentración de Cd en LF. Por encima del P75 sucedía al contrario, existiendo una correlación positiva a favor de las que hacían ejercicio físico (Tabla 70) (Fig 69). Este hallazgo no lo hemos encontrado en ninguna referencia bibliográfica.



**Figura 69.** Diagrama de cajas entre concentración Cd en pelo y ejercicio físico última semana.



**Tabla 70.** Contingencia y  $\chi^2$  entre cuartiles de concentración de Cd en LF y ejercicio última semana

Tabla cruzada			Ejercicio físico durante la pasada semana		
			No	SÍ	Total
Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	Hasta 0'1405	Recuento	26	13	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	66,7%	33,3%	100,0%
	De 0'1406 a 0'4920	Recuento	19	21	40
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	47,5%	52,5%	100,0%
	De 0'4921 a 1'1075	Recuento	27	12	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	69,2%	30,8%	100,0%
Mayor de 1'1076		Recuento	15	24	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	38,5%	61,5%	100,0%
Total		Recuento	87	70	157
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	55,4%	44,6%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	10,563 <sup>a</sup>	3	,014		
Razón de verosimilitud	10,689	3	,014		
Asociación lineal por lineal	3,077	1	,079		
N de casos válidos	157				

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 17,39.

✓ Cruzando los cuartiles de la concentración de **Cd** en **LF** con los cuartiles del consumo de **mariscos y moluscos** en raciones / mes encontramos una  $p = 0,052$  (9 gl), al borde de la significación, que quizá se podría haber alcanzado con un mayor número de casos (Tabla 71).

**Tabla 71.** Cotingencia y Chi-cuadrado entre la concentración de Cd en LF y consumo de marisco

Tabla cruzada							
			Grupos según consumo de marisco (raciones/mes)				
			Menos de 2	3 a 4	5 a 6	7 o más	Total
Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	Hasta 0´1405	Recuento	9	13	8	9	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	23,1%	33,3%	20,5%	23,1%	100,0%
	De 0´1406 a 0´4920	Recuento	17	9	6	8	40
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	42,5%	22,5%	15,0%	20,0%	100,0%
	De 0´4921 a 1´1075	Recuento	16	5	12	6	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	41,0%	12,8%	30,8%	15,4%	100,0%
	Mayor de 1´1076	Recuento	11	3	14	11	39
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	28,2%	7,7%	35,9%	28,2%	100,0%
	Total	Recuento	53	30	40	34	157
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en folículo (nanog/g)	33,8%	19,1%	25,5%	21,7%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado							
		Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)			
Chi-cuadrado de Pearson		16,787 <sup>a</sup>	9	,052			
Razón de verosimilitud		17,112	9	,047			
Asociación lineal por lineal		,712	1	,399			
N de casos válidos		157					

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 7,45.

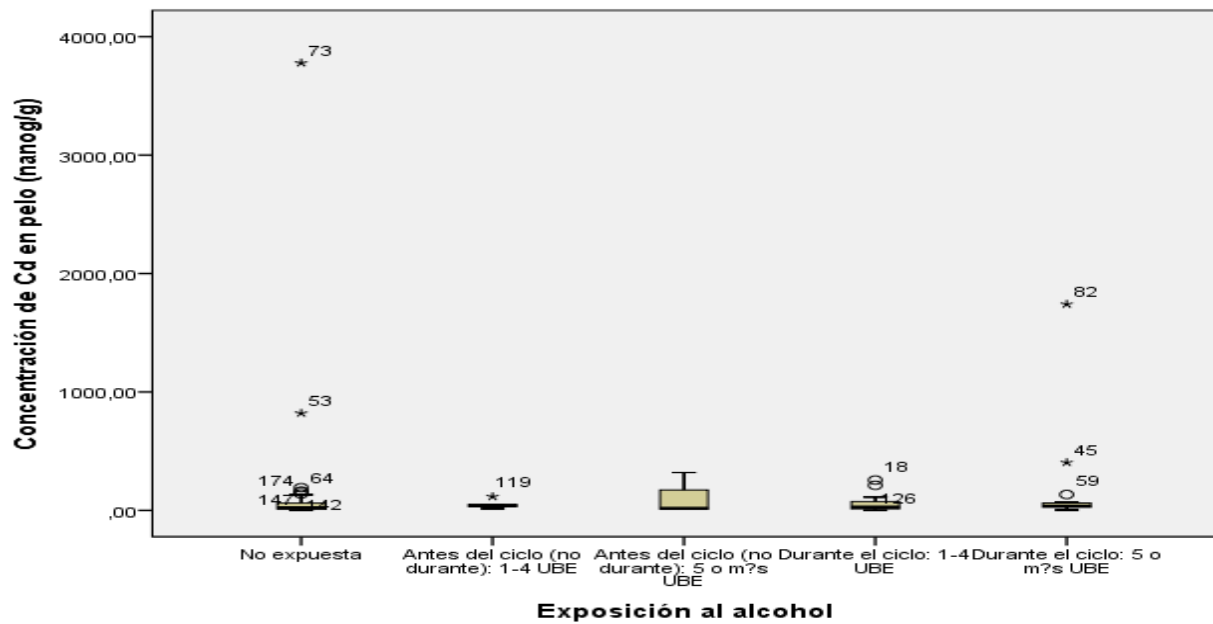
✓ Cruzando los cuartiles de la concentración de **Cd** en **pelo** con el consumo de **alcohol**, dividiendo los grupos en no expuestas frente a expuestas a 1-4 UBE semanales y 5 o más UBE antes del ciclo, junto a las expuestas a 1-4 UBE y 5 o más EBE durante el ciclo, hallamos diferencias, con  $p = 0,12$  (12 gl), observando que en los cuartiles de las concentraciones de Cd en las no expuestas no había cambios de frecuencias sustanciales, sin embargo en el grupo de las expuestas a 1-4 UBE antes del ciclo se acumulaban más casos en proporción 4/1 por debajo del percentil 50 de la concentración de Cd en pelo y en las expuestas a 5 o más UBE sucedía justo lo contrario, acumulándose los casos en proporción 3/1 por encima del P50 de la concentración de Cd en pelo. Con el consumo durante el ciclo, las que lo hacían entre 1-4 UBE, se acumulaban casi el doble por debajo del P50 del Cd en pelo, mientras las que consumían alcohol por encima de 5 UBE semanales, se acumulaban 3 veces más por encima del P50 del Cd en pelo. Este hallazgo nos hace pensar en la posible influencia de la administración de agonistas de la GnRH o de

gonadotropinas como común denominador de esta población, las cuales podrían explicar el cambio de comportamiento de las concentraciones de Cd en pelo con respecto al momento y cantidad de consumo de alcohol por parte de estas pacientes. Sin embargo, cuando cruzamos el Cd en pelo entre las expuestas y no expuestas no encontramos diferencias. (Tabla 72) (Figs. 70 y 71).

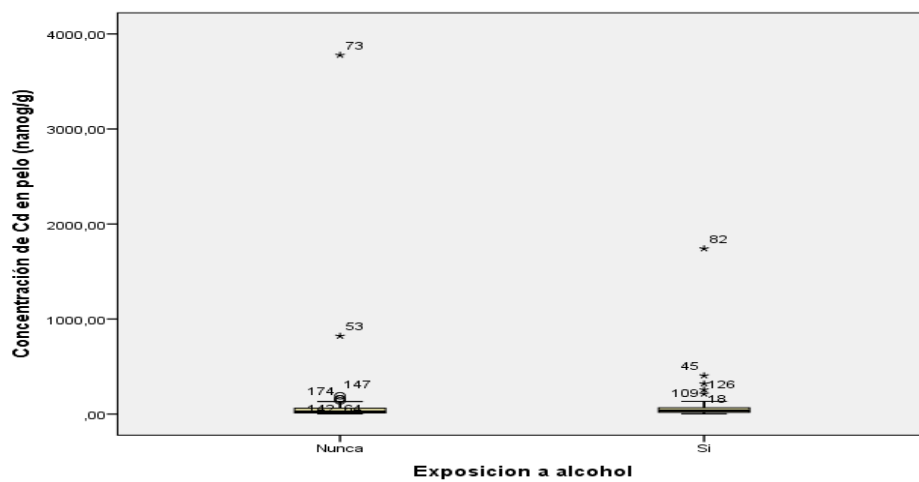
**Tabla 72.** Contingencia entre cuartiles concentración de Cd en pelo y consumo alcohol

		Tabla cruzada					
		Exposición al alcohol					Total
		No expuesta	Antes del ciclo (no durante): 1-4 UBE	Antes del ciclo (no durante): 5 o más UBE	Durante el ciclo: 1-4 UBE	Durante el ciclo: 5 o más UBE	
Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	Hasta 12'4225	Recuento	33	0	2	11	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	67,3%	0,0%	4,1%	22,4%	100,0%
	De 12'4226 a 26'9510	Recuento	35	1	1	9	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	70,0%	2,0%	2,0%	18,0%	100,0%
	De 26'9511 a 62'5325	Recuento	24	3	0	5	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	49,0%	6,1%	0,0%	10,2%	100,0%
	Mayor de 62'5326	Recuento	30	1	1	9	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	61,2%	2,0%	2,0%	18,4%	100,0%
	Total	Recuento	122	5	4	34	197
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Cd en pelo (nanog/g)	61,9%	2,5%	2,0%	17,3%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado							
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)				
Chi-cuadrado de Pearson	25,608 <sup>a</sup>	12	,012				
Razón de verosimilitud	26,076	12	,010				
Asociación lineal por lineal	2,385	1	,122				
N de casos válidos	197						

a. 8 casillas (40,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,99.



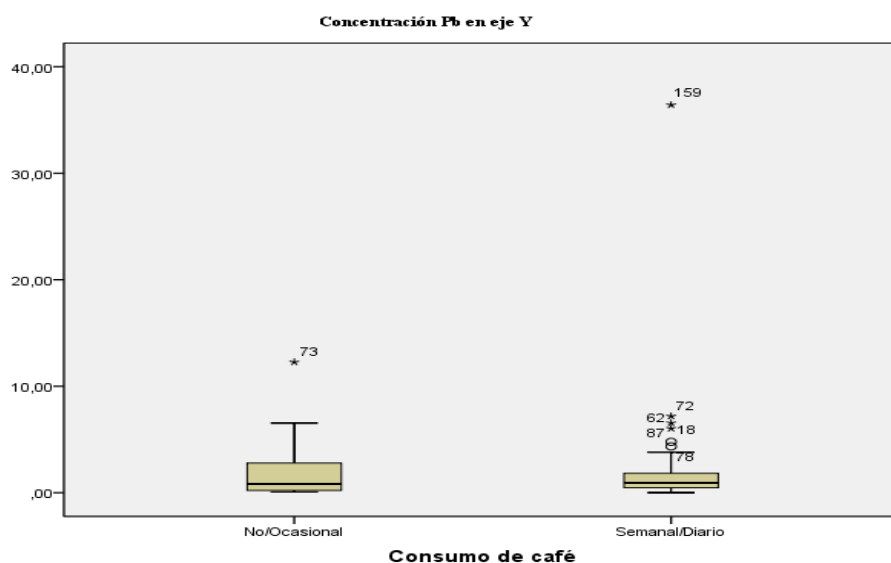
**Figura 70.** Diagrama de cajas de exposición al alcohol antes y durante el ciclo de FIV.



**Figura 71.** Diagrama de cajas del consumo de alcohol dicotómico: ns.

✓ Con el **Hg** en **LF** y **pelo** y **exposición a tóxicos**, no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa. En el cruce con consumo de mariscos y moluscos con Hg en pelo hallamos una  $p = 0,056$  (9 gl), muy cercana a la significación, que quizás con un número mayor de casos se hubiese logrado. Por otro lado, en cuanto al consumo de atún no hallamos diferencias en las concentraciones de mercurio ni en LF ni en pelo, con lo que la clásica asociación entre consumo de atún y la acumulación de Hg en el organismo no queda reflejada en nuestra población de pacientes de FIV.

✓ Con el **Pb** en el **LF** y **pelo** asociado al resto de variables de exposición, sólo encontramos diferencias en el cruce de Pb en pelo con el consumo de café entre no expuestas o consumo ocasional y las consumidoras a diario con  $p = 0.043$  (3 gl), donde el 77,9% de los casos se acumulaba por encima del P25 de la concentración de Pb en pelo (Tabla 73) (Fig 72). Cabría preguntarse si tiene algo que ver este hallazgo con el cambio de tendencia del consumo de café en cápsulas metálicas.



**Figura 72.** Diagrama de cajas entre Pb en pelo (eje Y) y consumo de café (eje X).

**Tabla 73.** Contingencia entre cuartiles concentración Pb en pelo y consumo de café

Tabla cruzada					
			Consumo de café		Total
			No/Ocasional	Semanal/Diario	
Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)	Hasta 0´4460	Recuento	15	34	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)	30,6%	69,4%	100,0%
	De 0´4461 a 0´9650	Recuento	8	42	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)	16,0%	84,0%	100,0%
	De 0´9651 a 1´9668	Recuento	6	44	50
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)	12,0%	88,0%	100,0%
	Mayor de 1´9669	Recuento	15	34	49
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)	30,6%	69,4%	100,0%
	Total	Recuento	44	154	198
		% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)	22,2%	77,8%	100,0%
	Pruebas de Chi-cuadrado				
		Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	
Chi-cuadrado de Pearson	8,134 <sup>a</sup>	3	,043		
Razón de verosimilitud	8,375	3	,039		
Asociación lineal por lineal	,023	1	,878		
N de casos válidos	198				

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 10,89.

## E. Origen de la esterilidad y metales en LF y pelo

Analizamos las variables origen de la esterilidad agrupadas en femenina, masculina, mixta, origen desconocido y mujer sola sin pareja y no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a su asociación con las concentraciones de metales pesados en LF y pelo.

## F. Resultados del proceso y metales pesados en LF y pelo

Transformamos las siguientes variables indicadoras de resultados adversos: no ovocitos válidos para ICSI / ovocito no fecundado tras ICSI / embrión no transferido en

fresco / no embarazo bioquímico tras TE / no embarazo clínico evolutivo tras ecografía / aborto / parto con algún nacido con secuelas /y añadimos una con resultado positivo que fue parto con nacidos sin alteración, no hallando ninguna diferencia significativa asociada a los metales pesados en LF y pelo.

#### **G. Baja respuesta a la HEOC y metales pesados en LF y pelo**

Analizamos si existía alguna diferencia cruzando los cuartiles de las concentraciones de metales pesados en LF y pelo con la variable baja respuesta dicotomizada en NO > 6 folículos desarrollados y SÍ < 6 folículos desarrollados y no encontramos ninguna.

#### **H. Ovocitos recuperados y metales pesados en LF y pelo**

Transformamos en dicotómica la variable ovocitos recuperados, dividiendo los grupos en < 6 y > 6 y los cruzamos con las variables transformadas en cuartiles metales pesados en LF y pelo, y no encontramos diferencias estadísticas.

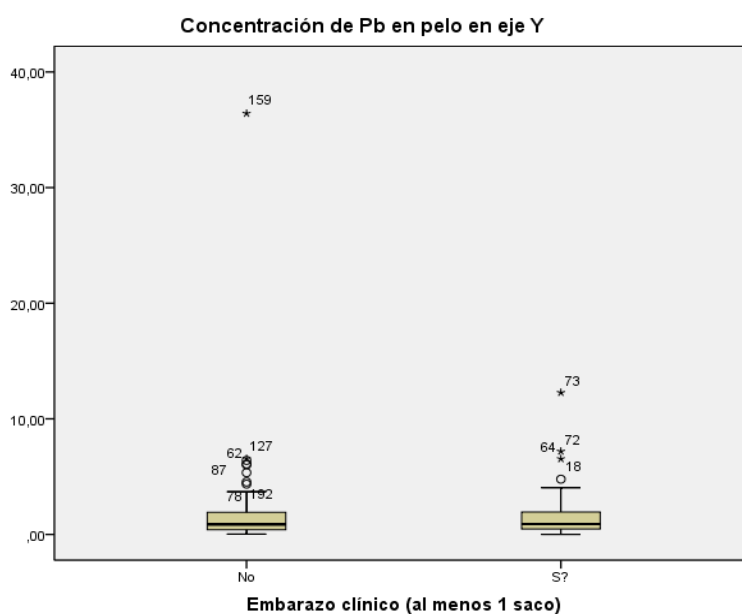
#### **I. Gestación clínica y metales pesados en LF y pelo**

En cuanto a uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral que consistía en estudiar la asociación entre marcadores de toxicidad medioambiental en líquido folicular y su relación con las tasas de gestación, analizamos de igual forma que en los apartados anteriores las posibles diferencias entre las tasas de gestación clínica con al menos 1 saco intrauterino detectado por ecografía como variable cualitativa categórica cruzada con las variables (transformadas en cuartiles) concentraciones de *As*, *Cd*, *Hg* y *Pb*, tanto en *LF* como en *pelo*, y hallamos sólo 1 diferencia significativa con correlación inversa. Se trataba de la concentración de *Pb en pelo*, con  $p = 0,048$ . (3 gl) (Tabla 74) (Fig. 73). Este hallazgo incierto podría ser investigado en el futuro como un posible *biomarcador* de exposición, con la ventaja de su fácil acceso y conservación que, de confirmarse, podría ser de gran utilidad para ayudar con otros factores a establecer un pronóstico para los resultados en FIV. Serían necesarios más estudios para verificarlo.

**Tabla 74.** Contingencia y Chi-cuadrado entre cuartiles concentración Pb en pelo y gestación clínica en FIV

Tabla cruzada					
Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)			Embarazo clínico (al menos 1 saco)		Total
			No	SÍ	
Hasta 0'4460	Recuento		37	12	49
	% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)		75,5%	24,5%	100,0%
De 0'4461 a 0'9650	Recuento		24	26	50
	% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)		48,0%	52,0%	100,0%
De 0'9651 a 1'9668	Recuento		31	19	50
	% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)		62,0%	38,0%	100,0%
Mayor de 1'9669	Recuento		30	19	49
	% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)		61,2%	38,8%	100,0%
Total	Recuento		122	76	198
	% dentro de Cuartiles según la concentración de Pb en pelo (microg/g)		61,6%	38,4%	100,0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	7,925 <sup>a</sup>	3	,048		
Razón de verosimilitud	8,069	3	,045		
Asociación lineal por lineal	,840	1	,359		
N de casos válidos	198				

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 18,81.



**Figura 73.** Diagrama de cajas entre Pb en pelo y gestación clínica en FIV.



## J. Resultados del proceso y resto de variables

Siguiendo la metodología de los apartados anteriores, tomamos las siguientes variables categóricas indicadoras de resultados adversos: no ovocitos válidos para ICSI / ovocito no fecundado tras ICSI / embriones bloqueados / embrión no transferido en fresco / no embarazo bioquímico tras TE / no embarazo clínico evolutivo tras ecografía / aborto / parto con algún nacido con secuelas / y añadimos una novena categoría con resultado positivo que fue parto con nacidos sin alteración, hallando los siguientes resultados:

✓ Ejercicio físico durante la última semana: entre las categorías NO / SÍ ejercicio físico la última semana, no encontramos ninguna diferencia.

✓ Origen de la esterilidad: entre las categorías femenina / masculina / mixta / EOD, no hallamos diferencias.

✓ Exposición al **tabaco**: al cruzar esta variable transformada en 9 categorías (no expuesta / pasiva < 4 horas diarias / pasiva > 4 horas diarias / aac 1-5 cd / aac 6-10 cd / aac > 11 cd / adc 1-5 cd / adc 6-10 cd / adc > 11 cd, donde los significados de las siglas son cd: cigarrillos diarios, aac: fumadora activa antes del ciclo y adc: fumadora activa durante el ciclo), con las variables transformadas de resultados del proceso, encontramos diferencias significativas con  $p = 0,009$  (64 gl). Los resultados adversos se acumularon mayoritariamente en el grupo de las no expuesta o expuestas al humo del tabaco menos de 4 horas, salvo las de **ausencia de ovocitos válidos para ICSI** que se acumularon todas en el grupo de las fumadoras de más de 6 cd, aunque sólo hubo 3 casos. Al transformar la variable de exposición al tabaco en dicotómica (no expuesta / expuesta) y cruzarla con las variables de resultados, se desvanecieron las diferencias ya que al haber muchas casillas en blanco el test Chi-Cuadrado no resulta concluyente y nuestro número de casos no era suficientemente amplio para estimar las diferencias repartidas en excesivas categorías.

✓ Consumo de café: categorizada en no u ocasional / SÍ, no hallamos ninguna diferencia.

✓ Consumo de alcohol: realizamos las mismas categorías que en el cruce con metales pesados y no encontramos ninguna diferencia.

✓ Exposición a **tóxicos ambientales** declarados en el cuestionario: realizamos la transformación en variable dicotómica NO / SÍ y hallamos diferencias significativas con  $p = 0,08$  (8 gl). Paradójicamente, los resultados adversos se concentraron en el lado de las no expuestas, salvo el parto de *recién nacido vivo sin secuelas* que fue estadísticamente significativo a favor de las **no expuestas**. Existían pocos casos para hallar diferencias en todas las categorías, por tanto el valor de este resultado es limitado. (Tabla 75).

**Tabla 75.** Contingencia t Chi-cuadrado entre resultados del proceso y exposición a tóxicos

Tabla cruzada					
		Exposición a tóxicos ambientales		Total	
		NO	SÍ		
Resultado del proceso	Ovocito no inyectado	Recuento	3	0	3
		% dentro de Resultado del proceso	100,0%	0,0%	100,0%
	Ovocito no fecundado tras ICSI	Recuento	4	5	9
		% dentro de Resultado del proceso	44,4%	55,6%	100,0%
	Embriones bloqueados	Recuento	1	0	1
		% dentro de Resultado del proceso	100,0%	0,0%	100,0%
	Embrión no transferido en fresco	Recuento	12	0	12
		% dentro de Resultado del proceso	100,0%	0,0%	100,0%
	No embarazo bioquímico tras TE	Recuento	106	14	120
		% dentro de Resultado del proceso	88,3%	11,7%	100,0%
	No embarazo clínico tras TE	Recuento	6	1	7
		% dentro de Resultado del proceso	85,7%	14,3%	100,0%
	Aborto	Recuento	11	2	13
		% dentro de Resultado del proceso	84,6%	15,4%	100,0%
	Parto con nacidos sin alteración	Recuento	29	3	32
		% dentro de Resultado del proceso	90,6%	9,4%	100,0%
	Parto con algún nacido con secuelas	Recuento	5	3	8
		% dentro de Resultado del proceso	62,5%	37,5%	100,0%
Total	Recuento	177	28	205	
	% dentro de Resultado del proceso	86,3%	13,7%	100,0%	
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)		
Chi-cuadrado de Pearson	20,720 <sup>a</sup>	8	,008		
Razón de verosimilitud	17,252	8	,028		
Asociación lineal por lineal	,211	1	,646		
N de casos válidos	205				

a. 10 casillas (55,6%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,14.

✓ Riesgo de exposición laboral a tóxicos: al ser un grupo muy heterogéneo, realizamos la transformación en variable dicotómica NO / SÍ y no encontramos ninguna diferencia.

✓ Alimentación y consumo de agua mineral: realizamos las mismas categorías que en el cruce con metales pesados y no hallamos ninguna diferencia significativa.

✓ Comorbilidades y antecedentes de alergia: realizamos las mismas categorías que con los metales pesados y no hallamos tampoco ninguna diferencia.

✓ Endometriosis: dicotomizada en NO / SÍ, no nos dio ninguna diferencia significativa.

✓ Ausencia o alteración del patrón ovulador y el SOP: dicotomizados en NO / SI, tampoco resultó con diferencias significativas.

✓ Baja respuesta ovárica: dicotomizada en NO / SÍ. En esta variable sí encontramos diferencias significativas con  $p = 0,027$  (8 gl). En no ovocitos viables para ICSI la diferencia fue 2/1 en el lado de la baja respuesta y en el resto de categorías la mayoría de los casos quedó del lado de la respuesta ovárica normal.

✓ Laparoscopia / laparotomía o histeroscopia / legrado previos al ciclo: variables dicotomizadas que no dieron ninguna diferencia significativa en cuanto a resultados del proceso.

✓ FSH basal  $> 12$  mUI/mL, cociente LH/FSH  $> 2$ , PRL  $> \text{ng/mL}$ , estradiol  $> 70$  pg/mL y TSH  $> 2,5$  mUI/mL en el último año: categorizadas en NO / SÍ, tampoco dieron diferencias.

✓ Protocolo de estimulación ovárica: establecimos 3 categorías: largo FSH / largo FSH + LH / otros, para estudiar su posible influencia sobre los resultados del proceso de la FIV antes mencionados y observamos que existían diferencias significativas con  $p = 0,014$  (16 gl). Al margen de otros protocolos, donde sólo hubo 6 pacientes, las diferencias se encontraron a favor del largo FSH + LH en no ovocitos viables para ICSI, donde se registraron los 3 casos (100%) que hubo, en no ovocitos fecundados (88,9%); a favor del largo FSH estuvieron el único caso que hubo de todos los embriones bloqueados, el 75% de no embriones transferidos en fresco, el 100% de no embarazo clínico evolutivo tras ecografía, el 61,5% de abortos y el 87,5% de los partos con recién nacidos con alguna anomalía; en no embarazo bioquímico tras transferencia embrionaria el reparto fue similar

en los 3 grupos y, por último, en parto con recién nacido sin anomalías, no hubo diferencias entre el grupo FSH (46,9%9 y FSH + LH (50%).

✓ Ajuste de dosis: con el ajuste de dosis de FSH no se encontraron diferencias, sin embargo, con el ajuste de dosis de LH sí hubo diferencias con  $p = 0,017$  (8 gl).

✓ Empleo de adyuvantes: se transformó la variable en dicotómica y se encontraron diferencias con  $p = 0,043$  (8 gl).

✓ Realización de algún ciclo previo: variable dicotómica NO / SÍ, que nos quedó al borde de la significación con  $p = 0,052$  (8gl).

✓ Cancelación de algún ciclo previo: la transformamos en dicotómica y no se hallaron diferencias significativas.

✓ Número de ovocitos recuperados: esta fue la última variable que analizamos transformándola en categórica dicotómica: 6 o menos ovocitos recuperados / más de 6 ovocitos recuperados y aquí sí observamos diferencias estadísticamente significativas con  $p = 0,005$  (8 gl), estando en el lado de  $< 6$  ovocitos recuperados el 100% de no ovocitos viables para ICSI y el 77,8% de ningún ovocito fecundado tras ICSI y el resto de categorías se acumulan con mayor frecuencia en el lado de ovocitos recuperados  $> 6$ .

Para finalizar, exponemos en una tabla resumen todas las diferencias estadísticamente significativas que hallamos en relación a la determinación de metales pesados en líquido folicular y pelo con las variables sociodemográficas, las de antecedentes y las de exposición.

También hallamos las correlaciones por edad dicotomizada en menor o igual de 35 años y mayor de 36, donde encontramos diferencias con  $p < 0,05$  en las variables que se representan sombreadas en gris (Tabla 76).

**Tabla 76.** Resumen de diferencias estadísticamente significativas encontradas entre las concentraciones de As, Cd, Hg y Pb en pelo y LF y las variables edad, sociodemográficas, antecedentes y exposición (en gris diferencias significativas encontradas con la edad de la mujer dicotomizada en  $\leq 35$  ó  $> 36$  años)

Relaciones significativas con variables sociodemográficas, antecedentes y exposición	As LF (microg /g)	Cd LF (nanog /g)	Hg LF (microg /g)	Pb LF (microg /g)	As pelo (microg /g)	Cd pelo (nanog /g)	Hg pelo (microg /g)	Pb pelo (microg /g)
Edad dicotomizada	0,024	-	-	-	-	-	-	-
Índice de masa corporal dicotomizado	-	-	-	-	-	-	-	-
Nivel de estudios (No-Básicos/Secundaria-Universitarios)	-	-	-	-	-	-	0,072	-
<b>Antecedentes</b>								
Embarazo previo	-	-	-	-	-	-	0,035	-
Aborto previo	-	0,051	-	-	-	-	0,092	0,071
Comorbilidades	0,029	-	-	-	-	-	-	-
Alergia	-	-	-	-	-	-	-	-
Endometriosis	-	0,001	-	-	-	-	-	-
Ausencia o alteración del patrón ovulador	-	-	0,010	-	0,042	-	0,054	-
Síndrome de ovario poliquístico	0,038	-	0,018	-	-	-	0,027	0,000
Baja respuesta ovárica	-	-	-	-	-	-	-	-
Laparoscopia o laparotomía previa	-	-	-	-	-	-	-	-
Histeroscopia o legrado previo	-	0,087	-	-	-	-	0,081	-
FSH basal durante el último año patológico ( $\geq 12$ mUI/ml)	0,042	0,029	0,086	-	-	-	-	-
Cociente LH/FSH patológico ( $\geq 2$ )	-	-	0,039	-	-	-	-	-
Estradiol basal durante el último año patológico ( $\geq 70$ )	-	-	0,094	-	-	-	-	-
PRL basal durante el último año patológico ( $\geq 30$ UI)	-	-	-	-	-	-	-	-
TSH basal durante el último año patológico ( $\geq 2,5$ UI)	-	0,031	-	-	-	-	-	-
<b>Estimulación ovárica</b>								
Protocolo combo	-	-	-	-	-	-	-	-
FSH: Variación de la dosis durante el ciclo	-	-	-	-	-	-	-	-
LH: Variación de la dosis durante el ciclo	-	-	-	-	-	0,012	-	-
Empleo de adyuvantes	-	-	-	-	-	-	-	-
Realización de ciclo previo	-	-	-	-	0,002	-	-	-
Cancelación de ciclo previo	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hábitos y exposición</b>								
Ejercicio físico la semana pasada	-	0,012	-	-	-	-	-	-
Exposición al tabaco	-	-	-	-	0,001	-	-	-
Consumo de café semanal o diario	0,082	-	-	-	-	-	-	0,048
Exposición al alcohol	-	-	-	-	-	0,004	-	-
Exposición a tóxicos ambientales	0,029	-	-	-	0,051	-	-	-
Exposición a tóxicos laborales	-	-	-	0,061	0,070	-	-	-
Consumo de agua mineral	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensalada en dieta	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo de huevos <2 veces/semana	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo de carne	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo de pescado	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo de mariscos	0,082	0,061	-	-	-	-	0,052	-
Consumo de atún <2 veces/semana	0,009	-	-	-	-	-	-	-
Consumo de conservas <2 veces/semana	-	-	-	-	-	-	-	-



La esterilidad se considera hoy día un problema de salud que va en aumento en las sociedades industrializadas. El concepto, como expusimos en la introducción, debe incluir a todas las parejas con imposibilidad de tener hijos en un periodo de tiempo que se estima para las mujeres menores de 35 años en 1 año y para las mayores en 6 meses, por tanto, la mayoría de las guías clínicas y las sociedades científicas recomiendan que las parejas con mujeres de menos de 35 años sean derivadas al especialista en medicina reproductiva al año y a las que tengan mujeres de más de 35 años a los 6 meses, salvo en los casos en que se conozca la causa que deben ser derivados de inmediato (Dunson, Colombo, & Baird, 2002). Es preferible emplear el término disfunción reproductiva para, por un lado abarcar tanto la esterilidad como la infertilidad, y por otro, tratar de no estigmatizar a estas parejas. A continuación iremos analizando nuestras variables estudiadas, tanto desde el punto de vista descriptivo como inferencial, para comparar nuestros hallazgos con los reportados en la literatura científica.

La incidencia de la disfunción reproductiva en nuestro medio oscila en torno al 18% de las parejas en edad fértil y su origen se distribuye según el análisis estadístico del registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) de 2013 en factor femenino 30,3%, factor masculino 24,4%, causas mixtas 25,8%, EOD 16,4%, serodiscordancia 0,6% y mujer sin pareja masculina 2,5% (Registro SEF, 2013).

En nuestra serie de 205 casos, de los 494 elegibles, la incidencia se configura de forma diferente, ya que el origen más frecuente fue el mixto con un 40,5%, en segundo lugar se situaba la femenina con un 25,4%, tercero la masculina pura con un 22%, cuarto la EOD con un 11,2% y por último la mujer sin pareja masculina con un 1%. No tuvimos parejas serodiscordantes ya que no se dispone en la URH del HRU de Málaga de laboratorio de RA de alta seguridad biológica centralizado a nivel público en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Llama la atención en nuestra serie la alta incidencia de esterilidad mixta con respecto a la presentada por la SEF.

Indudablemente, como ya es conocido, el factor más importante de la mujer desde el punto de vista reproductivo es la edad. Este factor en la muestra de



estudio se acota en un máximo de 40 años debido a la normativa en materia de acceso a las TRA en el sistema sanitario en el momento del estudio, por lo que nos vemos limitados, ya que como sabemos, la edad determina la reserva ovárica y, en nuestro caso, el tiempo de exposición a potenciales tóxicos que a dosis muy bajas actuarán por los distintos mecanismos genómicos (incluso epigenéticos) y no genómicos, sobre la esfera reproductiva y en otros órganos diana (Luzardo et al., 2009).

Otro factor relacionado con la disfunción reproductiva es el IMC que, no sólo disminuye la tasa de fecundidad, sino que además disminuye las tasas de éxito en las pacientes sometidas a TRA e incrementa la tasa de aborto, así, por cada unidad incrementada de IMC por encima de 29 queda reducida la probabilidad de lograr una gestación durante el primer año de búsqueda en un 5% (van der Steeg et al., 2008). A través del mecanismo de las leptinas del tejido adiposo y las kiss-peptinas hipotalámicas existe un efecto modulador sobre los pulsos de GnRH, e incluso a través de receptores encontrados en la células de la granulosa (Witchel & Tena-Sempere, 2013). En este sentido, también se ven afectadas las pacientes con un IMC por debajo de 18. En nuestro estudio no hemos podido valorar los extremos de IMC, ya que se incluyen por normativa las pacientes con un IMC de 18 a 32.

El tiempo de evolución de la esterilidad es otro factor pronóstico importante, no sólo por la causa subyacente, sino que por cada año de retraso en lograr una gestación, disminuye también un 5% la probabilidad de lograrla, hecho relacionado una vez más con la edad de la mujer

En cuanto a la etnia y el lugar de residencia son más bien factores relacionados con los estilos de vida que adoptan las pacientes en su hábitat.

El nivel académico se asocia más al retraso para el acceso a la maternidad de las mujeres que avanzan más en este sentido y al nivel de estrés que al hecho en sí de pertenecer a una categoría.

La actividad profesional puede relacionarse más bien con el nivel de estrés y la posible exposición a sustancias tóxicas y para analizar sus efectos serían necesarios estudios de cohortes a largo plazo (Luzardo et al., 2009), aunque la hayamos incluido en nuestro estudio.

En cuanto a los hábitos o estilos de vida, en lo referente al ejercicio físico, se ha descrito que las mujeres que realizan ejercicio físico intenso durante más de 4 horas semanales están expuestas a un 40% de la tasa de reducción de recién nacidos vivos. Nosotros para analizarlo pusimos también este punto de corte y elegimos como marcador la última semana para intentar controlar el nivel de hábito (Anderson et al., 2010).

El tabaco está ampliamente estudiado y, como vimos en la introducción, son conocidos sus efectos perjudiciales para la fertilidad a todos sus niveles, tanto en la fertilidad a través de su acción en ovario, trompas y receptividad uterina, como en los ciclos de FIV a través de la estimulación ovárica que precisa más dosis y días de gonadotropinas, menor cantidad y calidad de los ovocitos recuperados, menor cantidad y calidad embrionaria y menor tasa de fecundación, menor tasa de implantación y de gestación, mayor tasa de complicaciones obstétricas y de abortos (Anderson et al., 2010).

El consumo de alcohol relacionado con la fertilidad no ofrece muchos estudios publicados. Un estudio multicéntrico europeo con más de 10.000 parejas demostró que el consumo de alcohol por encima de 8 UBE semanales puede disminuir la fecundidad. Se ha asociado a alteraciones de la maduración folicular, alteraciones en la síntesis de hormonas esteroideas y por tanto con alteraciones ovulatorias. En los ciclos de FIV se han documentado una disminución de la respuesta ovárica a la HEOC, afectación de la calidad embrionaria y una menor tasa de implantación al producirse defectos de fase lútea. Además se ha descrito un aumento del riesgo de aborto de hasta 2,21 veces cuando se consume alcohol en el último mes antes del tratamiento de FIV (Klonoff-Cohen et al., 2003). Nosotros para analizar esta variable pusimos el corte en la mitad.

En cuanto a la cafeína, en la mujer se ha descrito mayor incidencia de infertilidad y aborto, pero con dosis superiores a 400 mg/día, o lo que es lo mismo, más de 5 tazas.

El nivel de estrés no lo hemos evaluado, ni tampoco la exposición a drogas de recreo y fármacos.

La exposición a tóxicos medioambientales como pesticidas, tintes y pigmentos, productos químicos fotográficos, lubricantes, aleaciones de metales,

humos de soldar y otros, los incluimos en el estudio a través del cuestionario de exposición y al ser una proporción de pacientes expuestas a cada tipo muy baja, las tuvimos que agrupar y hacer dicotómica por lo que su valor a nivel de resultados obtenidos se considera escaso.

El origen de la esterilidad tiene estrecha asociación con los resultados obtenidos, con lo cual debemos incluirla en el estudio para evaluar los resultados de FIV, aunque bien es cierto que el factor masculino es determinante, en esta ocasión se nos escapa del estudio.

El perfil hormonal gonadal, tiroideo y endocrino nos ayuda a conocer la reserva ovárica y corregir otras disfunciones antes de comenzar un ciclo de FIV.

Los hábitos alimentarios, además del tipo de agua consumida, los incluimos en el estudio para intentar determinar asociaciones con la exposición a metales pesados y su posible influencia en los resultados de FIV. Seleccionamos los alimentos de mayor consumo sin contar con los lácteos. No nos detuvimos en analizar la proporción y equilibrio de la dieta saludable para mejorar la fertilidad porque no fue planteado como objetivo.

Los antecedentes personales médicos, quirúrgicos, ginecológicos y obstétricos los incluimos para analizar posibles asociaciones relacionadas con la variación de las concentraciones de metales pesados en las matrices biológicas seleccionadas.

Como instrumento, aprovechamos que los protocolos de estimulación ovárica controlada en la UR del HRU de Málaga eran prácticamente fijos y uniformes, con lo que esta variable era más fácil de controlar respecto a otros estudios donde existe mayor diversidad en cuanto al uso de análogos/antagonistas de la GnRH, tipos de gonadotropinas y combinación de las mismas.

Las muestras biológicas seleccionadas para el estudio fueron el líquido folicular como muestra biológica de referencia y el pelo como muestra biológica alternativa de fácil acceso y preservación recogidas el día de la punción ovárica folicular. Los tóxicos seleccionados fueron elementos de conocido efecto perjudicial a nivel de salud general y reproductiva en particular, que como ya conocemos fueron el AS, Cd, Hg y Pb. El principal problema de estos elementos se relaciona con las bajas concentraciones alcanzadas en los distintos lugares del

organismo, por lo que se requieren por un lado métodos de espectrofotometría en laboratorios altamente cualificados y por otro, la criopreservación de las muestras de los líquidos y tejidos que lo precisan, como es el líquido folicular en nuestro caso. Además no siempre es posible concluir el análisis ya que para su detección deben estar por encima de su límite, por lo que se pudo realizar en el líquido folicular con el As en el 88%, Hg 82%, Pb 66% y Cd 67%; con el pelo la proporción de casos detectados fue en As 78%, Hg 100%, Pb 82% y Cd 83%. La ventaja del pelo pues es su fácil preservación y su mejor detección por lo que nos preguntamos si se podían correlacionar sus niveles en ambas muestras y así plantear métodos para su análisis y posibles aplicaciones en investigación para buscar algún biomarcador que pudiera ayudar a estas pacientes a mejorar sus resultados en FIV en particular y en salud en general. Sabemos que el líquido folicular es un ultrafiltrado del plasma que se empieza a formar en los folículos antrales cuya vida media hasta llegar a folículo maduro o de Graaf suele ser de 100 días, por tanto la exposición del ovocito si es que la sustancia problema se acumula en el LF es en teoría en este periodo. El ovocito es una célula muy sensible y exigente para cumplir la función de generar una nueva vida y tiene unos mecanismos tan sofisticados que es hasta capaz de reparar los daños de hebra simple del ADN del espermatozoide cuando realiza la fecundación (Bazrgar et al., 2014).

Ya en la punción ovárica, la tasa de recuperación ovocitaria depende de la capacidad de respuesta de la paciente a las gonadotropinas que se verá afectada por las variables anteriormente expuestas. El número óptimo de ovocitos recuperados oscila entre 6 y 18 para, por una lado no bajar la tasa de gestación y por otro, evitar el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (Fauser et al., 2014).

Entrando en los resultados, la tasa de ovocitos maduros MII es la verdadera materia prima para lograr una fecundación correcta, y su estudio es el principal objetivo de todos los trabajos relacionados con los resultados de la FIV (Ahelik et al., 2015).

Desde este punto, los acontecimientos van en cascada de embriones generados de calidad óptima para realizar la transferencia de los mismos en día +3 ó +2 generalmente y criopreservar los sobrantes o los que no se han podido transferir. Posteriormente se comprobará a los 19 ndías de media si existe gestación bioquímica.

Actualmente la FIV en muchos centros se prefiere recuperar el máximo número de ovocitos en un ciclo y proceder a la vitrificación de embriones ya que con esta mejora técnica se ha reportado que no debe caer la tasa de gestación. Otro objetivo es lograr que la mayoría de los centros se inclinen por la transferencia electiva de un solo embrión para lo cual se precisa un centro de excelencia, aunque en pacientes jóvenes no se afecta la tasa acumulada de embarazo, esta práctica no se recomienda en pacientes mayores (Fujimoto et al., 2015).

En todos los pasos se puede apreciar la merma pasando de folículos desarrollados a menor número de ovocitos maduros recuperados, menor número de embriones viables, menor número de gestaciones y por fin menor número de recién nacidos vivos que es el techo donde deben confluir todas las estadísticas y que es en realidad donde confluyen todos los centros dedicados a la reproducción asistida, ya que en el mejor de los casos no se supera el 25% por transferencia embrionaria realizada (Registro SEF, 2013).

Haciendo un recorrido descriptivo por nuestro estudio y utilizando las medidas de tendencia central, disponíamos de una población elegible de 494 pacientes correspondientes a los ciclos iniciados de FIV, de las cuales participaron en el mismo inicialmente 234 y luego quedaron en 205 que es nuestra N. Las 29 restantes fueron excluidas por cancelación del ciclo antes de la punción o por presentar un LF hemático o endometriósico que no era apto para el estudio.

Atendiendo a los datos de filiación, la media de edad atendida de 34,4 años ya hace referencia al desplazamiento hacia la derecha de esta población. El país de origen y la etnia en el 92,2% fue española caucásica. El lugar de residencia correspondía a Málaga capital en un 41,5% y en segundo lugar a Málaga Oeste, resultando un mayor número de pacientes provenientes de Teatinos, Churriana, Torremolinos y Benalmádena Costa, lo cual se explica porque estas zonas están más pobladas y además se acumulan más parejas en edad reproductiva. El nivel académico en contra de lo que cabría pensar en un centro asistencial público fue del 42% para las universitarias y la actividad laboral para asalariados en un 68,8%, encontrándose en el desempleo el 16,1%. El estrés, aunque no lo hemos estudiado, puede ser un factor de confusión importante a tener en cuenta en el perfil de nuestra muestra.

El IMC dio una media de 23,77%, con lo que no disponemos de datos para valorar los casos extremos.

El tiempo de evolución de esterilidad se situaba en una mediana de 4 años, con lo que según expusimos anteriormente es un factor pronóstico que ya apunta hacia resultados desfavorables.

Pasando a los estilos de vida y alimentación, practicaban ejercicio de más de 3 horas semanales solo el 18,6% de las participantes en las que posteriormente veremos los hallazgos observados.

Fumaba el 31,7% de las pacientes, si bien el 11,3% lo hacía por encima de 10 cigarrillos que es la cantidad considerada más perjudicial para el devenir reproductivo. Nos llama la atención, que de las fumadoras solo abandonaron el hábito tabáquico durante el ciclo el 11,2% según confesaron en el cuestionario.

El alcohol se consumía en el 34,2%, con patrón de fin de semana antes del ciclo el 30,7% y sólo bajó un 4,4% el consumo durante el ciclo. Por encima de 4 UBE bebía menos del 2% y la bebida más consumida era la cerveza, seguido de mezcla.

Con las dosis y la frecuencia relativamente bajas observadas no podemos obtener datos concluyentes en nuestra muestra sobre el consumo tabaco y alcohol.

La cafeína era consumida por el 77,6% de la población prácticamente a diario, pero no preguntamos la cantidad consumida.

La exposición directa a tóxicos medioambientales sólo representaba el 13,7% y tuvimos que agruparlas para intentar obtener algún dato.

El consumo de agua, aunque en otro contexto pueda tener connotaciones toxicológicas, lo incluimos en el estudio sin esperar nada de ello.

La alimentación la distribuimos en unidades y raciones semanales y mensuales según la frecuencia de consumo para crear grupos mayores y poder analizar e interpretar mejor los resultados, lo cual arrojó pocos datos, pero sí alguno interesante como veremos más adelante.

En cuanto a perfil hormonal alterado la FSH ocurrió en el 2,9%, el cociente LH/FSH >2 en el 3,4%, el estradiol basal >70 pg/mL en el 19,5%, la PRL

>30 mUI/mL en el 3,4% y lo que más nos llamó la atención fue que un 26,3% de las pacientes tenían una TSH >2,5 mUI/mL, de las cuales una alta proporción desarrollará un hipotiroidismo subclínico con sus consecuencias desfavorables reproductivas como todos sabemos.

En el origen de la esterilidad nuestra muestra se desvía de la estándar en que se acumula en mayor grado el factor masculino con un 22% como causa aislada y en un 40% de los casos participando en la esterilidad de origen mixto.

En cuanto a la recogida de las muestras biológicas para el estudio ya hemos referido la metodología, el procedimiento y las proporciones de detección y las concentraciones alcanzadas. El primer objetivo basado en los trabajos de Algar en pelo y líquido amniótico y Bloom en LF, sangre y orina se ve cumplido en esta tesis doctoral ya que logramos analizar lo que nos propusimos y, como se puede observar en el capítulo de resultados, ninguno de los analitos sigue una distribución normal de sus concentraciones en líquido folicular y pelo.

En cuanto a la HEOC, el 54,1% recibió protocolo largo con FSH sola, mientras que el 45,9% lo hizo con FSH + LH, lo que nos da una idea de la proporción de mujeres que requieren LH, las cuales suelen tener mayores problemas asociados a la edad o la baja respuesta. Los días de estimulación mayor de 11 también son considerados de mal pronóstico como ya es conocido en estudios realizados al respecto.

Referente a los resultados, la media de ovocitos MII fue de 7,2 por punción. En la bibliografía consultada se establece también como factor pronóstico un número de MII igual o superior a 9 para lograr una gestación con mayor facilidad, ya que ello nos permitirá una selección de los mejores embriones transferibles en fresco.

La fecundación media fue de 7,1 ovocito por punción lo cual no se aleja de lo habitual en un centro comparable

La tasa de gestación bioquímica quedó en 60 casos, o sea un 33,3% y la gestación clínica se logró en 53 casos, es decir un 28,9%, la cual resultó relativamente inferior a otros años y otros centros por alguna contingencia coyuntural que no afecta a nuestro estudio.

El número de partos fue de 40, o sea el 19,5% por punción y el 22,2% por transferencia.

Destaca la alta tasa de prematuridad con un 37,5%, de bajo peso al nacer < 2500 g con un 32,5% y la alta tasa de partos gemelares con un 30%, La tasa de cesáreas de las pacientes de nuestro estudio se situó en un 35%, mientras que la del Hospital Materno Infantil de Málaga fue en ese mismo año de un 29% (Memoria UGC Obstetricia y Ginecología del Hospital Regional Universitario de Málaga, 2014). Los resultados perinatales no se pueden atribuir a las técnicas de reproducción asistida en sí, ya que depende de otros factores como la edad de la madre, la patología uterina asociada y otros que no entraremos a analizar ya que se sale de nuestro propósito.

En cuanto al núcleo de esta tesis doctoral que trata sobre la determinación de marcadores de exposición a tóxicos en líquido folicular de pacientes estériles, sometidas a FIV y su relación con las tasas de gestación, existen innumerables artículos y publicaciones en revistas científicas acerca de la influencia de los tóxicos medioambientales sobre la fertilidad, tanto en la natural como en pacientes sometidas a TRA.

La mayoría de los datos al respecto se extraen de estudios observacionales como el que nos ocupa y está sujeto a sus propias limitaciones derivadas de que suelen ser muestras pequeñas, no son estudios randomizados y por tanto las conclusiones que se sacan deben ser tomadas con cautela. Los estudios experimentales en animales suelen sacar conclusiones de las condiciones extremas, hecho que no ocurre en los humanos, ya que la mayoría de las veces la exposición a potenciales tóxicos suele ser a dosis muy bajas pero sostenidas en el tiempo y, por tanto, a menudo pueden pasar desapercibidas y manifestarse cuando el daño ya se ha producido.

Los tóxicos medioambientales pueden actuar sobre la fertilidad tanto femenina como masculina por los mecanismos conocidos que ya expusimos anteriormente en la introducción en el apartado de toxicología. El comportamiento de los metales pesados como el Hg, ya expusimos que puede ejercer su acción por mecanismos epigenéticos a través de su combinación con grupos metilo formando el metilmercurio. Otro mecanismo ya expuesto es la generación de estrés oxidativo que



conduce a daño en el ADN, daño de membrana celular y de tejidos y la apoptosis celular, pueden conducir a efectos deletéreos a nivel reproductivo en ambos sexos.

Centrándonos en el tema que nos ocupa, nos planteamos este estudio para intentar determinar si era posible hallar la forma de encontrar una matriz biológica alternativa como el pelo, que es de fácil acceso y puede actuar como reservorio de sustancias potencialmente tóxicas para poder analizarlas en un momento determinado con la idea de obtener información a través de algún biomarcador.

Como existen innumerables sustancias, decidimos decantarnos por el estudio de 4 metales pesados de efectos tóxicos conocidos, y que sabíamos por los estudios de Algar et al. en pelo de mujeres embarazadas para la determinación de drogas de recreo por un lado, y los de Bloom et al., 2012 con el Cd, Pb y Hg en líquido folicular obtenido de punciones foliculares de mujeres sometidas a FIV por otro, podíamos aventurarnos a intentar correlacionar 2 matrices biológicas tan dispares como son el pelo y el líquido folicular y, de este modo, contribuir a la posibilidad de establecer una línea de investigación encaminada al análisis de sustancias y determinación y estudio de biomarcadores en pelo que puedan asociarse al diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las pacientes que padezcan disfunciones reproductivas.

Hasta aquí cumplimos los 2 primeros objetivos, el primero en determinar las concentraciones de tóxicos en líquido folicular y pelo en el contexto de las técnicas de reproducción asistida y el segundo en comprobar el tipo de distribución de sus concentraciones en sus correspondientes matrices biológicas que como dijimos no siguen un patrón normal.

El tercer objetivo y más apasionante fue intentar correlacionar las concentraciones de los tóxicos seleccionados, que en nuestro caso se trató de los 4 metales pesados As, Cd, Hg y Pb entre el líquido folicular y el pelo de la paciente de un mismo metal y con el resto de los analizados y encontramos que sí existía del mismo metal sólo encontramos correlación con el As entre líquido folicular y pelo, con el resto de los metales también encontramos correlaciones como se expresan en el capítulo de resultados. En la bibliografía consultada no hemos hallado ningún trabajo que intente asociar las concentraciones de metales pesados entre líquido folicular y pelo, por tanto si no nos encontramos con alguno podemos decir que

somos originales en este tema y que por supuesto serían necesarios más estudios para confirmar tanto nuestros hallazgos como los que en un futuro puedan realizarse. Por tanto, podemos considerar que logramos alcanzar el tercer objetivo.

Pasando al cuarto objetivo, fuimos cruzando una por una las variables de estudio con las concentraciones de metales pesados transformadas en cuartiles en las dos matrices biológicas de estudio y nos fuimos encontrando con diferencias estadísticamente significativas aplicando el test de Chi-cuadrado de Pearson. A continuación expresaremos que sucedió con cada metal y nos detendremos en los resultados que presentaron tales diferencias.

As en LF y edad de la paciente. Encontramos diferencias con la edad que hacía que se acumulasen más casos por encima del P50 en las pacientes mayores de 35 años. No hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica sobre el significado de este hallazgo, aunque es lógico pensar que la edad se asocie con el acúmulo de dicho metal, sin embargo no sucede con los demás.

As en LF y comorbilidad y SOP. Estuvieron al borde de la significación con 0,63 y 0,61 respectivamente. Quizá con mayor tamaño muestral se hubiera alcanzado.

As en LF y pelo cruzado con FSH basal  $> 12$  mUI/mL el último año. Encontramos correlación inversa entre As en LF y FSH alterada, pero la diferencia no fue significativa en pelo, aunque sólo habían 10 casos de FSH alterada por lo que deberían de hacerse más estudios para confirmar este hallazgo y estudiar sus posibles consecuencias hemos encontrado ninguna referencia en la literatura.

As en pelo y alteración o ausencia del patrón ovulador. Encontramos asociación inversa acumulándose más casos de As en pelo elevado en las que no tenían esta patología. Tampoco encontramos referencia bibliográfica

As en pelo y realización de ciclo previo de FIV. Aquí encontramos diferencia altamente significativa con correlación positiva. Este sería un biomarcador candidato a ser investigado y de confirmarse podría utilizarse como marcador pronóstico.

As en LF y consumo de atún. Encontramos correlación positiva con aumento de la concentración de As por encima del P50 en las consumidoras de 2 o

más raciones mensuales de atún. Tampoco encontramos referencias bibliográficas y también podría investigarse este hallazgo.

As en pelo y exposición al tabaco. Hallamos correlación inversa a favor de las no expuestas, si bien el número de casos de las expuestas era escaso. No hallamos diferencias en la comparación dicotómica, por tanto harían falta más estudios para confirmar este hallazgo.

As en pelo y tóxicos medioambientales. Encontramos una  $p = 0,53$ , cercana a la significación, pero el número de expuestas (21) era escaso y serían necesarios más estudios.

Cd en LF y antecedente de aborto. Encontramos correlación inversa acumulándose más casos de no abortos en las que tenían más Cd en LF. En otro estudio de Bloom et al., se correlaciona también de forma inversa el Cd y la gestación bioquímica pero no hace referencia al antecedente de aborto, por lo que debe haber algún efecto protector del Cd a determinadas concentraciones alcanzadas en LF. Este hallazgo debería ser más investigado.

Cd en LF y endometriosis. Encontramos una diferencia altamente significativa con correlación inversa acumulándose más casos de concentración más elevada de Cd en LF en el lado de las que no padecían endometriosis. (Pollack et al., 2013) estos autores estudian el tema y encuentran correlación inversa entre la concentración de Cd en sangre y la endometriosis, siendo favorable su acúmulo a determinados niveles.

Cd en LF y TSH  $> 2,5$  mUI/mL. Encontramos correlación inversa a favor de las que tenían la TSH normal. Es un hallazgo más a tener en cuenta en el efecto endocrino de los metales pesados (Lafuente et al., 2003).

Cd en pelo y ajuste de dosis de LH. Hallamos diferencias significativas con mayor número de ajuste de dosis de LH en las que tenían el Cd en pelo por encima del P50. Una vez más nos encontramos ante los posibles efectos de un metal que puede comportarse como disruptor endocrino. Como dijimos anteriormente no hay reportado ningún estudio al respecto en la literatura.

Cd en LF y ejercicio físico la última semana. Encontramos una correlación inversa con cambio de tendencia según el nivel de Cd en LF. Así, en las que no hacían ejercicio se acumulaban más casos de Cd por debajo del P50, sin

embargo, por encima del P75 de Cd en LF se acumulaban más casos en las que sí hacían ejercicio. No hemos encontrado referencias bibliográficas.

Cd en LF y consumo de moluscos y mariscos. Encontramos una  $p = 0,52$  cercana al nivel de significación y podría estudiarse si aumentando el número de casos se alcanzaría el nivel de significación. No encontramos referencias bibliográficas.

Cd en pelo y consumo de alcohol. Encontramos diferencias significativas con asociación inversa y cambio de tendencia según el momento y la cantidad consumida como se explica en el capítulo de resultados, lo cual nos hace pensar en la posible influencia del estímulo con gonadotropinas de este cambio. Ya sabemos por otros estudios como se expuso con anterioridad que el alcohol por sí mismo es capaz de influir negativamente sobre la esfera endocrina y sobre los resultados de la FIV.

Hg en pelo y antecedente de gestación. Encontramos diferencia significativa con mayor acúmulo de casos con Hg en pelo aumentado en las pacientes que no tenían embarazo previo. Este hallazgo tampoco lo hemos visto reflejado en la revisión bibliográfica y pensamos que también podría ser investigado como biomarcador.

Hg en LF y ausencia o alteración del patrón ovulador. Hallamos diferencias con correlación inversa donde más del 80% de los casos se encontraban por debajo del P50 del Hg en LF.

Hg en LF y SOP: También hallamos las mismas diferencias con el 80% de casos.

Hg en LF y alteración del cociente LH/FSH. En este caso el 100% de los casos se encontraban por debajo del P50 de la concentración de Hg en LF.

Los 3 hallazgos anteriores se pueden explicar de forma relativa, ya que sabemos que el **Hg** se comporta como un verdadero *disruptor endocrino* y por alguna razón se acumula menos en LF en las pacientes que tienen problemas ovulatorios. En la bibliografía consultada no hacen referencia a este hallazgo, sin embargo Bloom en su estudio no encuentra diferencias en el análisis multivariante entre el Hg y las tasas de gestación ( Bloom, Kim, et al., 2012)

Hg en pelo y alteración o ausencia del patrón ovulador. Nos quedamos al borde de la significación con  $p = 0,52$

***Hg en pelo y SOP.*** Ocurrió lo mismo que en LF y también podría ser candidato a ser estudiado como un posible biomarcador en una matriz biológica de fácil acceso.

La coincidencia de las diferencias significativas encontrada con el Hg asociadas a patología ovulatoria nos hace sospechar, como se describió en la introducción, sobre las implicaciones que este metal puede tener en las alteraciones del sistema endocrino (Iavicoli et al., 2009).

Hg en LF y consumo de mariscos y moluscos. Nos quedamos con una  $p = 0,056$  que quizá aumentando los casos hubiera alcanzado el nivel de significación.

Hg en LF y pelo y consumo de atún. Destacar que aquí no encontramos ninguna asociación.

Pb en LF y pelo en relación con antecedentes no ofreció ninguna diferencia significativa.

Pb en pelo y consumo de cafeína. Encontramos diferencias significativas con el 77.9% de las consumidoras situadas por encima del P25 de la concentración de Pb en pelo. Esto nos hace suponer que el consumo de café puede estar relacionado con el Pb y debería ser investigado. No hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica.

***Pb en pelo y tasa de gestación.*** Encontramos asociación inversa (diferencia estadísticamente significativa con  $p = 0,048$ ) en el análisis bivariado. Este hallazgo coincide con un trabajo acerca del mismo tipo de asociación que encontramos nosotros en el pelo. Sin embargo, ellos la encontraron entre Pb en LF y tasa de gestación cuando realizaron un estudio bivariado utilizando muestras de sangre, orina y LF, aunque un estudio posterior, aplicando el análisis de la multivarianza a una serie de tan solo 46 pacientes que iban a ser sometidas a FIV, ajustada por edad, etnia y tabaco la asociación no resultó estadísticamente significativa. (Bloom, Kim, et al., 2002). A nosotros, de entrada, no nos dio esa asociación como significativa en nuestro análisis. No obstante al no existir trabajos

entre Pb en pelo y tasa de gestación, se podría convertir este en un buen candidato a biomarcador..

Con este último punto damos por concluido el cuarto objetivo.

Estudiamos las diferencias entre los metales pesados en LF y pelo y la baja respuesta ovárica, la tasa de recuperación ovocitaria y el resto de variables de resultados y no hallamos ninguna.

Somos conscientes que para confirmar estos hallazgos habría que profundizar en el estudio con un análisis de multivarianza para intentar controlar los factores de confusión y que cuando lo realicemos según los hallazgos encontrados serían publicados.

Para terminar, cruzamos el resto de variables con los resultados del proceso de las pacientes sometidas a FIV y por mencionarlas encontramos diferencias en el tabaco que no se confirmó al dicotomizarla, en exposición a tóxicos medioambientales con diferencia favorables para las no expuestas en cuanto a recién nacido vivo sin secuelas. En los casos anteriores somos conscientes que las series cortas con pocos casos como la nuestra no son adecuadas para sacar conclusiones con el único dato de la encuesta de exposición y de la historia clínica. En la baja respuesta como es lógico pensar también se acumularon los resultados adversos. El tipo de protocolo también arrojó diferencias con resultados adversos para el grupo de FSH + LH, pero en este caso los resultados irían más relacionados con la edad y la baja respuesta que con el tipo de protocolo en sí.

Lo mismo sucedió con la necesidad de ajuste de LH y con el empleo de adyuvantes, y la explicación puede ser similar a la anterior. Para concluir cruzamos número de ovocitos recuperados con los resultados de la FIV y también mostraron diferencias significativas desfavorables para las de menos de 6 ovocitos como cabía esperar. Con ésto cumplimos el quinto y último objetivo.

Se logró establecer una cohorte de 52 recién nacidos para seguimiento y estudios sucesivos.



Las limitaciones presentadas en nuestro estudio las podríamos dividir en cinco apartados:

**a)** Limitaciones del propio sistema. En el ámbito del estudio, sometido a una normativa, no disponemos del universo estadístico, lo cual conlleva un sesgo de selección de la muestra.

**b)** Limitaciones de los analitos y las matrices biológicas de estudio, ya que los primeros presentan grandes variaciones individuales en su metabolismo y las segundas en su fisiología.

**c)** Del propio diseño del estudio. Aunque considerable en comparación con otros estudios revisados en la literatura, nuestro tamaño muestral es relativamente pequeño y acumula relativamente pocos casos para hacer inferencias sobre exposición a potenciales tóxicos basándonos en los datos de la encuesta cuando a veces ni la propia paciente es consciente del riesgo de exposición y por tanto o no lo comunica o distorsiona la información

**d)** De la técnica de laboratorio de espectrofotometría que encuentra ciertas dificultades para estudiar los analitos referidos.

**e)** De la propia comunidad científica, en la que al no haberse encontrado trabajos similares perdemos la posibilidad de contrastar los resultados y además, la construcción de variables de estudio no son uniformes en todos los grupos, con lo que poder comparar los resultados es tarea difícil.





1. Existe la posibilidad de cuantificar y correlacionar sustancias potencialmente tóxicas entre el líquido folicular, como matriz biológica de referencia y el pelo, como matriz biológica alternativa de fácil acceso y preservación, que a su vez nos podría proporcionar información sobre la exposición crónica a concentraciones difícilmente detectables de dichas sustancias, con la cual se podrían evaluar sus posibles efectos sobre la fertilidad en general, y en las pacientes que van a ser sometidas a FIV, en particular.

2. El *As en pelo* presentó 5 de las 9 correlaciones positivas que encontramos entre los distintos metales estudiados en ambas matrices biológicas, además de ser el único que se correlacionaba consigo mismo entre estos dos compartimentos, por la que conociendo su concentración, podríamos indirectamente hallar las de los demás. De este hallazgo no existe actualmente ninguna referencia en la bibliografía consultada, por lo que esperamos que futuras investigaciones nos aclaren su significado si se confirma dicha asociación.

3. En las asociaciones de las distintas variables estudiadas hemos encontrado diversas correlaciones entre las que destacan *As en pelo* y ciclo previo de FIV; *As en LF* y consumo de atún; *Hg en pelo* y antecedente de gestación; *Hg en pelo* y SOP y por último y la más importante desde nuestra perspectiva la correlación inversa entre la concentración de *Pb en pelo* y la tasa de gestación.

4. El estudio de metales pesados en el pelo de las pacientes con disfunción reproductiva podría abrir un campo de investigación para desarrollar *biomarcadores* que pudieran aportarnos información diagnóstica, ayudar al plan terapéutico y facilitar el establecimiento de un pronóstico en Medicina de la Reproducción.

5. El pelo es una matriz biológica alternativa de gran utilidad hoy en día en el campo de la pericia médico-legal, además de estar siendo investigado en otras disciplinas, pero los resultados obtenidos en su análisis han de interpretarse con suma cautela debido a la elevada dispersión de sus resultados y al elevado número de factores de confusión que pueden afectarlo.

6. Para confirmar nuestros hallazgos sería necesario desarrollar un modelo multivariante que despeje los posibles factores de confusión, con lo que podríamos determinar la importancia relativa de cada asociación si se demuestra su existencia.

7. Los estudios toxicológicos y el análisis de sus consecuencias en salud reproductiva son tremendamente complejos y precisan de equipos multidisciplinares para su desarrollo. En este sentido, las conclusiones sobre los estudios realizados a veces llegan a ser hasta contradictorias, con lo que aún nos queda un largo trayecto para poder llegar a conocer con más exactitud los innumerables factores implicados en la Biología de la Reproducción.

8. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados sobre toxicología y fertilidad se basan, por un lado en estudios experimentales sobre modelos animales y, por otro, en estudios epidemiológicos. Los primeros tienen el inconveniente de que son difícilmente extrapolables a los humanos, ya que las condiciones de laboratorio, ni las biológicas se suelen corresponder con la exposición en la vida real, que generalmente es a bajas dosis, de larga duración y de múltiples compuestos. Los segundos, precisan de grandes poblaciones de sujetos expuestos y no expuestos para poder obtener resultados sólidos y concluyentes, sin embargo, la mayoría de los trabajos presentados en la literatura se sustentan sobre series muy limitadas.

9. Serían necesarios más estudios para intentar estandarizar las técnicas y los métodos utilizados, establecer puntos de corte (*“cut-off”*) para lograr discriminar los límites toxicológicos de los múltiples compuestos tanto naturales como de síntesis que pueden llegar a afectar a un proceso tan sensible y delicado como es la reproducción humana y, con todo ello, desarrollar estrategias para poder mejorar los resultados obtenidos.



## Documento de consentimiento informado para recogida de muestras biológicas



Hospital Regional Universitario  
CARLOS HAYA  
Servicio Andalúz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

**BioBanco Hospitalario Carlos Haya**  
Hospital Civil - Pabellón 5- Sótano Telf: 951 29 02 24  
[biobanco.hch.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:biobanco.hch.sspa@juntadeandalucia.es)

**COPIA PARA HISTORIA**

### 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

#### 2.1. DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del Donante:

DNI / NIE:

NUHSA:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE del/de la representante legal:

#### 2.2. PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Apellidos y nombre del profesional

Fecha

Firma

#### 2.3. CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. .... declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas y he podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Manifiesto mi voluntad de donar mis muestras biológicas y permitir el tratamiento de los datos asociados a la misma al BioBanco, procedente de:

☐ Excedente del procedimiento diagnóstico, terapéutico o quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido.....

☐ La obtención de forma expresa.....

Asimismo, consiento el tratamiento de los datos clínicos asociados a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratadas de la siguiente forma:

☐ **Codificada** (serán identificadas por un código, desligándose de la información que me identifica, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

☐ **Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo establecer restricciones respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: ☐ SI ☐ NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:

Autorizo a recibir información de los datos genéticos y otros de carácter personal obtenidos durante la investigación relativa a mi salud: ☐ SI ☐ NO

Sé que puedo revocar, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En Málaga, a de de 20

El/La Donante

El/La Representante legal (sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:



## **Documento de consentimiento informado y cuestionario de estudio.**

Este estudio permitirá disponer de una metodología de análisis útil para su aplicación en el análisis del líquido FOLICULAR y una pequeña porción de PELO. De esta forma, solicitamos su colaboración voluntaria en esta investigación. Su participación consistirá en:

- 1) Responder a un cuestionario sobre la exposición a diversas sustancias en algún momento de su vida.
- 2) Recogida de una muestra de su cabello (un mechón pequeño cortado desde la raíz del cuero cabelludo).
- 3) Recogida de una muestra de 2 cc del líquido FOLICULAR ya extraído al realizarse su punción ovárica folicular.

Estas intervenciones tienen lugar durante su visita en el hospital motivada por la realización de su punción ovárica folicular indicada por su ginecólogo/a. No suponen ningún riesgo adicional para la mujer además de los derivados de la aplicación de la técnica de punción, que forma parte de la práctica clínica habitual.

Este estudio tendrá una duración prevista de 1 año, durante el cual se incluirán en él aproximadamente 250 mujeres.

Posteriormente se realizará un seguimiento de los recién nacidos para evaluar los efectos a medio y largo plazo resultantes de la exposición a drogas de abuso.

El investigador responsable de este estudio es el médico del Servicio de Obstetricia y Ginecología, del Hospital Carlos Haya de Málaga, D. ISAAC COHEN CORCIA.

El Servicio de Obstetricia y Ginecología, del Hospital Carlos Haya le garantiza el anonimato de todos los datos sobre usted y su hijo/hija y cualquier resultado.

Si necesita más información o aclaraciones pregunte a los investigadores, ellos le explicarán los detalles que requiera.

Usted puede negarse a participar en el estudio. No tiene por qué explicar los motivos. Su negativa a participar no afectará los cuidados que le ofrezcan a usted o su recién nacido.

Si ahora decide participar pero más tarde prefiere no hacerlo, comuníquelo a los investigadores para que la excluyan.

El Servicio de Obstetricia y Ginecología, del Hospital Carlos Haya de Málaga le garantiza el anonimato de todos los datos sobre usted y su hijo/a y cualquier resultado. Se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki. Se seguirá la normativa legal sobre la confidencialidad de los datos (Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de Protección de Datos de carácter personal (LOPD)). Si queda alguna parte de una de las muestras después del análisis, será destruida. **Si tras leer esta información decide participar, deberá firmar un impreso de consentimiento informado.**

**ANEXO 3. Consentimiento informado para el estudio**

***TÍTULO DEL PROYECTO: Líquido FOLICULAR y PELO, como matriz biológica alternativa: biomarcadores de la exposición a sustancias de abuso\* y tóxicos ambientales en pacientes que van a ser sometidas a una FIV.***

*(según Anexo 6, punto 2 del Real Decreto 561/1993 de 16-04-1993)*

Yo (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

---

Investigador (Nombre y Apellidos)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera.

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

---

Fecha Firma del participante

---

Fecha Firma del investigador





## B.2 Pareja

16. ¿Fuma?

☐ Si ☐ No

17. Cantidad de cigarrillos diarios:

## C. CAFÉINA

18. ¿Cuántas veces consume **durante el ciclo de FIV** bebidas como refrescos de cola, café?

☐ De 1 a 3 veces al mes

☐ 3 - 4 veces a la semana

☐ 1 - 2 veces a la semana

☐ Casi a diario o diariamente

## D. ALCOHOL

19. ¿Ha consumido bebidas alcohólicas antes o **durante** el ciclo de FIV?

☐ Si

☐ No

LABORABLES			FESTIVOS		
Bebida	Recipiente	Nº/día	Bebida	Recipiente	Nº/día
20. Cerveza	Vaso, lata, jarra, botella, mediana, quinto		21. Cerveza	Vaso, lata, jarra, botella, mediana, quinto	
22. Vino	Vaso, copa, botella		23. Vino	Vaso, copa, botella	
24. Licores	Chupito, copa, combinados		25. Licores	Chupito, copa, combinados	
26. Cava, vermut, carajillos	Copa, vasito		27. Cava, vermut, carajillos	Copa, vasito	

## E. FÁRMACOS

28. ¿Durante el ciclo de FIV ha tomado alguno de los siguientes medicamentos? ☐ Si ☐ No

MEDICAMENTO	FRECUENCIA
28.1. ANTIDEPRESIVO Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.2. ANSIOLÍTICO-SEDANTE (Tranquilizantes, pastillas para dormir) Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.3. RELAJANTES MUSCULARES Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.4. Medicamento para ALERGIA Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.5. Medicamento para BAJAR COLESTEROL Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.6. Medicamento para GRIPE, RESFRIADO, GARGANTA Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.7. Medicamento para HIPERTENSION Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.8. ANTIBIÓTICOS Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.9. Medicamentos para problemas del TIROIDES Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.10. ANTIINFLAMATORIOS Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.11. ANALGÉSICOS Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.12. Medicamentos para problemas DIGESTIVOS Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.13. Medicamentos para DIABETES Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca

28.14. ANTICONCEPTIVOS Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.15. RECONSTITUYENTES (Vitaminas, minerales...) Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
28.16. OTROS Nombre:	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca

29. ¿Cuánto tiempo lleva U.d. con el tratamiento?

- ☐ Menos de 1 año  
☐ Entre 1 y 2 años  
☐ Entre 2 y 3 años  
☐ Entre 3 y 5 años  
☐ Entre 5 y 10 años  
☐ Más de 10 años

#### F. SUSTANCIAS DE ABUSO (\*excluidas del estudio)

30. ¿Durante algún momento ha tomado alguna sustancia como? ☐ Si ☐ No

31. Cuáles:

SUSTANCIA	FRECUENCIA
31.1. Marihuana, hachís	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
31.2. Cocaína	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
31.3. Heroína, metadona	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca
31.4. Anfetaminas, éxtasis	<input type="checkbox"/> Diario, <input type="checkbox"/> semanal, <input type="checkbox"/> ocasional, <input type="checkbox"/> nunca

#### G. OTROS CONTAMINANTES AMBIENTALES

32. ¿Cuál es la categoría profesional que tiene en la empresa donde trabaja?

- ☐ Trabajador por cuenta propia sin asalariados  
☐ Trabajador por cuenta propia con 10 o más asalariados  
☐ Trabajador por cuenta propia con menos de 10 asalariados  
☐ Gerente de una empresa con 10 o más asalariados  
☐ Gerente de una empresa con menos de 10 asalariados  
☐ Capataz, supervisor o encargado  
☐ Otro asalariado

33. ¿Cuánto tiempo lleva Ud. trabajando en ese puesto?

- ☐ Menos de 1 año  
☐ Entre 1 y 2 años  
☐ Entre 2 y 5 años  
☐ Entre 5 y 10 años  
☐ Más de 10 años

34. ¿Qué medio de transporte utiliza Ud. para desplazarse a su lugar de trabajo?

- ☐ Vehículo propio  
☐ Vehículo ajeno  
☐ Motocicleta  
☐ Bicicleta  
☐ Transporte público  
☐ Ninguno

35. ¿Está en contacto con alguno de estos productos en su trabajo o en otras actividades profesionales?

- ☐ Pesticidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas...)
- ☐ Fertilizantes
- ☐ Pinturas y barnices
- ☐ Tintes y pigmentos
- ☐ Conservantes de la madera
- ☐ Productos químicos fotográficos
- ☐ Productos para el curtido y/o conservación de pieles
- ☐ Aceites industriales (lubricantes)
- ☐ Estabilizantes industriales
- ☐ Aleaciones de metales (níquel, cromo, cobre...)
- ☐ Humos de soldar
- ☐ Cemento
- ☐ Con ninguno

36. ¿Ha desempeñado Ud. alguno de estos puestos de trabajo como mínimo durante un año?

**36. 1. Agricultor/a**

36.1.a. Bajo plástico ☐

36.1.b. Usando herbicidas o insecticidas ☐

**36. 2. Silvicultor/ a** ☐

**36. 3. Minería**

36.3.a. Cobre ☐

36.3.b. Arsénico ☐

36.3.c. Cadmio ☐

36.3.d. Cromo ☐

36.3.e. Níquel ☐

**36. 4. Fundición**

36.4.a. Con acero ☐

36.4.b. Con aleaciones especiales ☐

36.4.c. Con cobre ☐

36.4.d. Con níquel ☐

**36.5. Electrolgalvanizado** ☐

**36. 6. Industria química**

36.6.a. Refinería ☐

36.6.b. Tintes o pinturas ☐

36.6.c. Laboratorio ☐

36.6.d. Fertilizantes ☐

36.6.e. Insecticidas o herbicidas ☐

**36.7. Industria textil**

36.7.a. Con tintes ☐

36.7.b. Preparación de fibras o tejidos ☐

**36.8. Industrias de pieles y curtidos** ☐

**36.9. Industrias de madera**

36.9.a. Uso o producción de conservantes de la madera ☐

**36.10. Industria del metal**

36.10.a. Tornero o fresador ☐

36.10.b. Soldador ☐

36.10.c. Cromados ☐

**36.11. Astilleros (construcción naval)** ☐

**36.12. Industria del vidrio** ☐

**36.13. Fabricación de cerámica** ☐

**36.14. Imprenta, artes gráficas** ☐

**36.15. Producción de pilas y baterías** ☐

**36.16. Industrias de construcción**

36.16.a. Asfaltado ☐

36.16.b. demoliciones ☐

**36.17. Industria energética**

36.17.a. Industria nuclear ☐

36.17.b. Central térmica ☐

**36.18. Industria papelera** ☐

**36.19. Transportes**

36.19.a. Conductor de camión ☐

36.19.b. Conductor de taxi ☐

36.19.c. Conductor de autobús ☐

- 36.20. Producción de cementos ☐
- 36.21. Incineradoras de residuos ☐
- 36.22. Pirotecnia ☐
- 36.23. Pintor/a ☐
- 36.24. Soldador/ a ☐
- 36.25. Peluquero/a ☐
- 36.26. Trabajador/a de bisutería ☐
- 36.27. Trabajador/a de gasolinera ☐
- 36.28. Reparación de automóviles ☐
- 36.29. Médicos o servicios de Salud ☐

37. ¿Ha desempeñado su pareja alguno de estos puestos de trabajo como mínimo durante un año?

- 37. 1. Agricultor/a
  - 37.1.a. Bajo plástico ☐
  - 37.1.b. Usando herbicidas o insecticidas ☐
- 37.2. Silvicultor/ a ☐
- 37.3. Minería
  - 37.3.a. Cobre ☐
  - 37.3.b. Arsénico ☐
  - 37.3.c. Cadmio ☐
  - 37.3.d. Cromo ☐
  - 37.3.e. Níquel ☐
- 37.4. Fundición
  - 37.4.a. Con acero ☐
  - 37.4.b. Con aleaciones especiales ☐
  - 37.4.c. Con cobre ☐
  - 37.4.d. Con níquel ☐
- 37.5. Electrolgalvanizado ☐
- 37.6. Industria química
  - 37.6.a. Refinería ☐
  - 37.6.b. Tintes o pinturas ☐
  - 37.6.c. Laboratorio ☐
  - 37.6.d. Fertilizantes ☐
  - 37.6.e. Insecticidas o herbicidas ☐
- 37.7. Industria textil
  - 37.7.a. Con tintes ☐
  - 37.7.b. Preparación de fibras o tejidos ☐
- 37.8. Industrias de pieles y curtidos ☐
- 37.9. Industrias de madera
  - 37.9.a. Uso o producción de conservantes de la madera ☐
- 37.10. Industria del metal
  - 37.10.a. Torno o fresador ☐
  - 37.10.b. Soldador ☐
  - 37.10.c. Cromados ☐
- 37.11. Astilleros (construcción naval) ☐
- 37.12. Industria del vidrio ☐
- 37.13. Fabricación de cerámica ☐
- 37.14. Imprenta, artes gráficas ☐
- 37.15. Producción de pilas y baterías ☐
- 37.16. Industrias de construcción
  - 37.16.a. Asfaltado ☐
  - 37.16.b. demoliciones ☐
- 37.17. Industria energética
  - 37.17.a. Industria nuclear ☐
  - 37.17.b. Central térmica ☐
- 37.18. Industria papelera ☐
- 37.19. Transportes
  - 37.19.a. Conductor de camión ☐
  - 37.19.b. Conductor de taxi ☐
  - 37.19.c. Conductor de autobús ☐
- 37.20. Producción de cementos ☐
- 37.21. Incineradoras de residuos ☐
- 37.22. Pirotecnia ☐
- 37.23. Pintor/a ☐

- 37.24. Soldador/ a ☐
- 37.25. Peluquero/a ☐
- 37.26. Trabajador/a de bisutería ☐
- 37.27. Trabajador/a de gasolinera ☐
- 37.28. Reparación de automóviles ☐
- 37.29. Médicos o servicios de Salud ☐

38. ¿Cuál es la ocupación de su pareja? \_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|

39. ¿Con qué frecuencia ha utilizado Ud. insecticidas o herbicidas en las labores de jardinería?

- ☐ Mucho
- ☐ Poco
- ☐ Nada

40. ¿Con qué frecuencia ha realizado Ud. en los últimos siete días las actividades que se mencionan?

FRECUENCIAS	40.a. Ejercicio físico	40.b. Desplazamientos a pie	40.c. Jardinería	40.d. Bricolaje
Nada				
Menos de 1 h.				
De 1 a 2 horas				
De 2 a 3 horas				
De 3 a 4 horas				
De 4 a 5 horas				
De 5 a 6 horas				
De 6 a 7 horas				
Más de 7 horas				

#### H. CONSUMO DE AGUA

41. ¿Qué tipo de agua bebe habitualmente?

- ☐ Agua del grifo
- ☐ Agua mineral
- ☐ Ambas

42. ¿Qué tipo de agua del grifo?

- ☐ De la red
- ☐ De un pozo
- ☐ NS/NC

43. ¿Qué tipo de agua utiliza para cocinar habitualmente?

- ☐ Agua del grifo
- ☐ Agua mineral
- ☐ Ambas

44. ¿Qué tipo de agua del grifo?

- ☐ De la red
- ☐ De un pozo
- ☐ Ns/Nc

## I. TÓXICOS EN ALIMENTACIÓN

	> 6 veces/día	4-6 veces/día	2-3 veces/día	1 vez/día	5-6 veces/sem	2-4 veces/sem	1 vez/sem	1-3 veces/mes	Casi nunca
45. Huevos									
46. Ensalada									
47. Ensalada Mixta									
48. Carne cerdo									
49. Carne Vacuno									
50. Pollo									
51. Rosada									
52. Merluza o similar									
53. Boquerones									
54. Sardinas									
55. Gambas o similar									
56. Camarones									
57. Cangrejos									
58. Mejillones									
59. Almejas									
60. Atún									
61. Latas de Conservas									



- Abbott, B. D., Schmid, J. E., Pitt, J. A., Buckalew, A. R., Wood, C. R., Held, G. A., & Diliberto, J. J. (1999). Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*, 155(1), 62-70. doi:10.1006/taap.1998.8601
- Abdalla, H., & Thum, M. Y. (2004). An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*, 19(4), 893-898. doi:10.1093/humrep/deh141
- Abdelouahab, N., Mergler, D., Takser, L., Vanier, C., St-Jean, M., Baldwin, M., . . . Chan, H. M. (2008). Gender differences in the effects of organochlorines, mercury, and lead on thyroid hormone levels in lakeside communities of Quebec (Canada). *Environ Res*, 107(3), 380-392. doi:10.1016/j.envres.2008.01.006
- Abhilash, P. C., & Singh, N. (2009). Pesticide use and application: an Indian scenario. *J Hazard Mater*, 165(1-3), 1-12. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.10.061
- Aboulghar, M., Mansour, R., Serour, G., Abdrazek, A., Amin, Y., & Rhodes, C. (2001). Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of unexplained infertility should be limited to a maximum of three trials. *Fertil Steril*, 75(1), 88-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163821>
- Aboulghar, M. A., Mansour, R. T., Serour, G. I., & Al-Inany, H. G. (2003). Diagnosis and management of unexplained infertility: an update. *Arch Gynecol Obstet*, 267(4), 177-188. doi:10.1007/s00404-002-0300-0
- Abraham, R., Ringwood, N., & Mankes, R. (1984). Ultrastructural observations on rabbit blastocysts after maternal exposure to cadmium chloride. *J Reprod Fertil*, 70(1), 323-325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6694147>
- Abshagen, K., Behre, H. M., Cooper, T. G., & Nieschlag, E. (1998). Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertil Steril*, 70(2), 355-356. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696234>
- Agarwal, A., Sharma, R. K., Desai, N. R., Prabakaran, S., Tavares, A., & Sabanegh, E. (2009). Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology*, 73(3), 461-469. doi:10.1016/j.urology.2008.07.053
- Agusa, T., Kunito, T., Iwata, H., Monirith, I., Chamnan, C., Tana, T. S., . . . Tanabe, S. (2007). Mercury in hair and blood from residents of Phnom Penh (Cambodia) and possible effect on serum hormone levels. *Chemosphere*, 68(3), 590-596. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.003
- Ahamed, M., & Siddiqui, M. K. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta*, 383(1-2), 57-64. doi:10.1016/j.cca.2007.04.024
- Ahelik, A., Mandar, R., Korrovits, P., Karits, P., Talving, E., Rosenstein, K., . . . Kullisaar, T. (2015). Systemic oxidative stress could predict assisted reproductive technique outcome. *J Assist Reprod Genet*, 32(5), 699-704. doi:10.1007/s10815-015-0466-6
- Ahlborg, U. G., Brouwer, A., Fingerhut, M. A., Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., Kennedy, S. W., . . . et al. (1992). Impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls on human and environmental health, with special emphasis on application of the toxic equivalency factor concept. *Eur J Pharmacol*, 228(4), 179-199. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1335882>
- Ahmadi, F., Zafarani, F., & Shahrzad, G. (2014). Hysterosalpingographic appearances of female genital tract tuberculosis: part I. Fallopian tube. *Int J Fertil Steril*, 7(4), 245-252. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520493>
- Aksoy, M., Tek, I., Karabulut, H., Berker, B., & Soylemez, F. (2005). The role of thrombophilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions. *J Pak Med Assoc*, 55(3), 104-108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852745>
- Al-Inany, H., & Aboulghar, M. (2002). GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod*, 17(4), 874-885. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11925376>



- Al-Inany, H. G., Youssef, M. A., Aboulghar, M., Broekmans, F., Sterrenburg, M., Smit, J., & Abou-Setta, A. M. (2011). Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*(5), CD001750. doi:10.1002/14651858.CD001750.pub3
- Albano, C., Felberbaum, R. E., Smits, J., Riethmuller-Winzen, H., Engel, J., Diedrich, K., & Devroey, P. (2000). Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. European Cetrorelix Study Group. *Hum Reprod*, 15(3), 526-531. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686191>
- Alborzi, S., Ravanbakhsh, R., Parsanezhad, M. E., Alborzi, M., Alborzi, S., & Dehbashi, S. (2007). A comparison of follicular response of ovaries to ovulation induction after laparoscopic ovarian cystectomy or fenestration and coagulation versus normal ovaries in patients with endometrioma. *Fertil Steril*, 88(2), 507-509. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.134
- Alkolombre, P. (2014). [The desire for a child in today parenthood: Infertility and reproductive techniques]. *Vertex*, 25(117), 382-386. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545086>
- Altmae, S., Martinez-Conejero, J. A., Salumets, A., Simon, C., Horcajadas, J. A., & Stavreus-Evers, A. (2010). Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod*, 16(3), 178-187. doi:10.1093/molehr/gap102
- Anderson, K., Nisenblat, V., & Norman, R. (2010). Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 50(1), 8-20. doi:10.1111/j.1479-828X.2009.01119.x
- Apostoli, P., & Catalani, S. (2008). [Carcinogenicity of metallic elements: general considerations about their identification and monitoring and about their main mechanisms of action. Part 1: general aspects]. *G Ital Med Lav Ergon*, 30(2), 186-191. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19068867>
- Arck, P. (2004). [Stress and embryo implantation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 33(1 Pt 2), S40-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968045>
- Arslan, M., Morshedi, M., Arslan, E. O., Taylor, S., Kanik, A., Duran, H. E., & Oehninger, S. (2006). Predictive value of the hemizona assay for pregnancy outcome in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 85(6), 1697-1707. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.11.054
- Asero, P., Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Mongioi, L., Vicari, E., Lanzafame, F., . . . La Vignera, S. (2014). Relevance of genetic investigation in male infertility. *J Endocrinol Invest*, 37(5), 415-427. doi:10.1007/s40618-014-0053-1
- Assumpcao, C. R. (2014). [Premature ovarian failure]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 58(2), 132-143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830590>
- Augood, C., Duckitt, K., & Templeton, A. A. (1998). Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*, 13(6), 1532-1539. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688387>
- Balasch, J., & Fabregues, F. (2002). Is luteinizing hormone needed for optimal ovulation induction? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 14(3), 265-274. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032381>
- Ballantyne, C. (2008). Better tests boost IVF success. *Nat Med*, 14(11), 1169. doi:10.1038/nm1108-1169a
- Bancsi, L. F., Broekmans, F. J., Mol, B. W., Habbema, J. D., & te Velde, E. R. (2003). Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis.



*Fertil Steril*, 79(5), 1091-1100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738501>

- Banu, S. K., Stanley, J. A., Sivakumar, K. K., Arosh, J. A., Barhoumi, R., & Burghardt, R. C. (2015). Identifying a novel role for X-prolyl aminopeptidase (Xpnpep) 2 in CrVI-induced adverse effects on germ cell nest breakdown and follicle development in rats. *Biol Reprod*, 92(3), 67. doi:10.1095/biolreprod.114.125708
- Bao, H., Vepakomma, M., & Sarkar, M. A. (2002). Benzo(a)pyrene exposure induces CYP1A1 activity and expression in human endometrial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81(1), 37-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127040>
- Barbieri, R. L., Sluss, P. M., Powers, R. D., McShane, P. M., Vitonis, A., Ginsburg, E., & Cramer, D. C. (2005). Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 83(2), 302-308. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.07.956
- Barker, D. J. (2003). The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*, 18(8), 733-736. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12974544>
- Barnea, E. R., & Shurtz-Swirski, R. (1992). Modification of pulsatile human chorionic gonadotrophin secretion in first trimester placental explants induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Hum Reprod*, 7(3), 305-310. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587934>
- Barnhart, K., Dunsmoor-Su, R., & Coutifaris, C. (2002). Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 77(6), 1148-1155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057720>
- Baron, J. A., La Vecchia, C., & Levi, F. (1990). The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. *Am J Obstet Gynecol*, 162(2), 502-514. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2178432>
- Battista, N., Pasquariello, N., Di Tommaso, M., & Maccarrone, M. (2008). Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 82-89. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01684.x
- Bazrgar, M., Gourabi, H., Yazdi, P. E., Vazirinasab, H., Fakhri, M., Hassani, F., & Valojerdi, M. R. (2014). DNA repair signalling pathway genes are overexpressed in poor-quality pre-implantation human embryos with complex aneuploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 175, 152-156. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.01.010
- Becker, G. F., Passos, E. P., & Moulin, C. C. (2015). Short-term effects of a hypocaloric diet with low glycemic index and low glycemic load on body adiposity, metabolic variables, ghrelin, leptin, and pregnancy rate in overweight and obese infertile women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 102(6), 1365-1372. doi:10.3945/ajcn.115.117200
- Bedaiwy, M. A., Falcone, T., Sharma, R. K., Goldberg, J. M., Attaran, M., Nelson, D. R., & Agarwal, A. (2002). Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod*, 17(2), 426-431. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821289>
- Bellis, M. A., Baker, R. R., Matson, P., & Chew, J. (1990). A guide to upwardly mobile spermatozoa. *Andrologia*, 22(5), 397-399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2073049>
- Bernstam, L., & Nriagu, J. (2000). Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 3(4), 293-322. doi:10.1080/109374000436355
- Bhan, A., & Sarkar, N. N. (2005). Mercury in the environment: effect on health and reproduction. *Rev Environ Health*, 20(1), 39-56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15835497>
- Binder, H., Strick, R., Zaherdoust, O., Dittrich, R., Hamori, M., Beckmann, M. W., & Oppelt, P. G. (2012). Assessment of FSHR variants and antimullerian hormone in infertility

- patients with a reduced ovarian response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril*, 97(5), 1169-1175 e1161. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.012
- Binns, C. W., Lee, A. H., & Fraser, M. L. (2008). Tea or coffee? A case study on evidence for dietary advice. *Public Health Nutr*, 11(11), 1132-1141. doi:10.1017/S1368980007001589
- Bjorndahl, L. (2011). What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Hum Fertil (Camb)*, 14(3), 179-186. doi:10.3109/14647273.2011.580823
- Bloom, M. S., Fujimoto, V. Y., Steuerwald, A. J., Cheng, G., Browne, R. W., & Parsons, P. J. (2012). Background exposure to toxic metals in women adversely influences pregnancy during in vitro fertilization (IVF). *Reprod Toxicol*, 34(3), 471-481. doi:10.1016/j.reprotox.2012.06.002
- Bloom, M. S., Kim, K., Kruger, P. C., Parsons, P. J., Arnason, J. G., Steuerwald, A. J., & Fujimoto, V. Y. (2012). Associations between toxic metals in follicular fluid and in vitro fertilization (IVF) outcomes. *J Assist Reprod Genet*, 29(12), 1369-1379. doi:10.1007/s10815-012-9882-z
- Boada, L. D., Lara, P. C., Alvarez-Leon, E. E., Losada, A., Zumbado, M. L., Liminana-Canal, J. M., . . . Luzardo, O. P. (2007). Serum levels of insulin-like growth factor-I in relation to organochlorine pesticides exposure. *Growth Horm IGF Res*, 17(6), 506-511. doi:10.1016/j.ghir.2007.05.004
- Boadi, W. Y., Shurtz-Swirski, R., Barnea, E. R., Urbach, J., Brandes, J. M., Philo, E., & Yannai, S. (1992). Secretion of human chorionic gonadotropin in superfused young placental tissue exposed to cadmium. *Arch Toxicol*, 66(2), 95-99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1605736>
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 22(6), 1506-1512. doi:10.1093/humrep/dem046
- Bolumar, F., Olsen, J., & Boldsen, J. (1996). Smoking reduces fecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity. The European Study Group on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol*, 143(6), 578-587. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8610675>
- Bolumar, F., Olsen, J., Rebagliato, M., & Bisanti, L. (1997). Caffeine intake and delayed conception: a European multicenter study on infertility and subfecundity. European Study Group on Infertility Subfecundity. *Am J Epidemiol*, 145(4), 324-334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054236>
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., Hjelmberg, P. S., Reinert, T. S., Andersen, B. S., Lesovoy, V., Lindh, C. H., . . . Bonde, J. P. (2006). Xenoestrogenic activity in blood of European and Inuit populations. *Environ Health*, 5, 12. doi:10.1186/1476-069X-5-12
- Boomsma, C. M., Keay, S. D., & Macklon, N. S. (2007). Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD005996. doi:10.1002/14651858.CD005996.pub2
- Bordel, R., Laschke, M. W., Menger, M. D., & Vollmar, B. (2006). Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod*, 21(3), 610-617. doi:10.1093/humrep/dei393
- Borm, G., & Mannaerts, B. (2000). Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. The European Orgalutran Study Group. *Hum Reprod*, 15(7), 1490-1498. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875855>

- Bose, H. S., Sato, S., Aisenberg, J., Shalev, S. A., Matsuo, N., & Miller, W. L. (2000). Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(10), 3636-3639. doi:10.1210/jcem.85.10.6896
- Bouyer, J. (2003). [Epidemiology of ectopic pregnancy: incidence, risk factors and outcomes]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 32(7 Suppl), S8-17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14699315>
- Bradley, R. J., & Rosen, M. P. (2004). Subfertility and gastrointestinal disease: 'unexplained' is often undiagnosed. *Obstet Gynecol Surv*, 59(2), 108-117. doi:10.1097/01.OGX.0000109223.04391.9D
- Brambilla, G., Fochi, I., Falce, M., De Filippis, S. P., Ubaldi, A., & di Domenico, A. (2008). PCDD and PCDF depletion in milk from dairy cows according to the herd metabolic scenario. *Chemosphere*, 73(1 Suppl), S216-219. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.071
- Brandes, M., van der Steen, J. O., Bokdam, S. B., Hamilton, C. J., de Bruin, J. P., Nelen, W. L., & Kremer, J. A. (2009). When and why do subfertile couples discontinue their fertility care? A longitudinal cohort study in a secondary care subfertility population. *Hum Reprod*, 24(12), 3127-3135. doi:10.1093/humrep/dep340
- Braune, B. M., & Malone, B. J. (2006). Mercury and selenium in livers of waterfowl harvested in Northern Canada. *Arch Environ Contam Toxicol*, 50(2), 284-289. doi:10.1007/s00244-005-7093-7
- Broekmans, F. J., Kwee, J., Hendriks, D. J., Mol, B. W., & Lambalk, C. B. (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 12(6), 685-718. doi:10.1093/humupd/dml034
- Broer, S. L., Mol, B. W., Hendriks, D., & Broekmans, F. J. (2009). The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril*, 91(3), 705-714. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.12.013
- Brustad, M., Sandanger, T. M., Nieboer, E., & Lund, E. (2008). 10th anniversary review: when healthy food becomes polluted-implications for public health and dietary advice. *J Environ Monit*, 10(4), 422-427. doi:10.1039/b800784p
- Bulletti, C., de Ziegler, D., Polli, V., Diotallevi, L., Del Ferro, E., & Flamigni, C. (2000). Uterine contractility during the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 15 Suppl 1, 81-89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928421>
- Bussmann, U. A., & Baranao, J. L. (2006). Regulation of aryl hydrocarbon receptor expression in rat granulosa cells. *Biol Reprod*, 75(3), 360-369. doi:10.1095/biolreprod.106.053017
- Cairns, T., Hill, V., Schaffer, M., & Thistle, W. (2004). Levels of cocaine and its metabolites in washed hair of demonstrated cocaine users and workplace subjects. *Forensic Sci Int*, 145(2-3), 175-181. doi:10.1016/j.forsciint.2004.04.033
- Cantu, J. M., Rivas, F., Hernandez-Jauregui, P., Diaz, M., Cortes-Gallegos, V., Vaca, G., . . . Ibarra, B. (1981). Meiotic arrest at first spermatocyte level: a new inherited infertility disorder. *Hum Genet*, 59(4), 380-385. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6800930>
- Card, J. P., & Mitchell, J. A. (1978). The effects of nicotine administration on deciduoma induction in the rat. *Biol Reprod*, 19(2), 326-331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/568956>
- Cetinkaya, M. B., Siano, L. J., Benadiva, C., Sakkas, D., & Patrizio, P. (2013). Reproductive outcome of women 43 years and beyond undergoing ART treatment with their own oocytes in two Connecticut university programs. *J Assist Reprod Genet*, 30(5), 673-678. doi:10.1007/s10815-013-9981-5

- Ciotti, P. M., Notarangelo, L., Morselli-Labate, A. M., Felletti, V., Porcu, E., & Venturoli, S. (2004). First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*, 19(10), 2334-2339. doi:10.1093/humrep/deh433
- Clifton, J. C., 2nd. (2007). Mercury exposure and public health. *Pediatr Clin North Am*, 54(2), 237-269, viii. doi:10.1016/j.pcl.2007.02.005
- Coco, R. (2014). Repro genetics: Preimplantational genetics diagnosis. *Genet Mol Biol*, 37(1 Suppl), 271-284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24764761>
- Cohlen, B. J., te Velde, E. R., Looman, C. W., Eijckmans, R., & Habbema, J. D. (1998). Crossover or parallel design in infertility trials? The discussion continues. *Fertil Steril*, 70(1), 40-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660418>
- Collier, A. C., Tingle, M. D., Paxton, J. W., Mitchell, M. D., & Keelan, J. A. (2002). Metabolizing enzyme localization and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption. *Hum Reprod*, 17(10), 2564-2572. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351530>
- Collins, J. A., Burrows, E. A., & Wilan, A. R. (1995). The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril*, 64(1), 22-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789569>
- Collins, J. A., & Crosignani, P. G. (1992). Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. *Int J Gynaecol Obstet*, 39(4), 267-275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1361459>
- Comte, F., Philip, C. A., Berthiller, J., Schott, A. M., Golfier, F., & Raudrant, D. (2014). [Hysteroscopic septoplasty: after miscarriages?]. *Gynecol Obstet Fertil*, 42(3), 139-143. doi:10.1016/j.gyobfe.2014.01.004
- Cooke, J. P., & Bitterman, H. (2004). Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases. *Ann Med*, 36(1), 33-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000345>
- Cooper, G. S., Baird, D. D., Hulka, B. S., Weinberg, C. R., Savitz, D. A., & Hughes, C. L., Jr. (1995). Follicle-stimulating hormone concentrations in relation to active and passive smoking. *Obstet Gynecol*, 85(3), 407-411. doi:10.1016/0029-7844(94)00381-M
- Cordts, E. B., Christofolini, D. M., Dos Santos, A. A., Bianco, B., & Barbosa, C. P. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet*, 283(3), 635-643. doi:10.1007/s00404-010-1815-4
- Coutifaris, C., Myers, E. R., Guzick, D. S., Diamond, M. P., Carson, S. A., Legro, R. S., . . . Network, N. N. C. R. M. (2004). Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*, 82(5), 1264-1272. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.03.069
- Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., . . . Tsang, B. K. (2007). Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci*, 12, 3628-3639. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485326>
- Crochet, J. R., Hawkins, K. C., Holland, D. P., & Copland, S. D. (2011). Diagnosis of pelvic tuberculosis in a patient with tubal infertility. *Fertil Steril*, 95(1), 289 e217-220. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.012
- Crosignani, P. G., Walters, D. E., & Soliani, A. (1991). The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report. European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod*, 6(7), 953-958. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1761665>



- Curtis, K. M., Savitz, D. A., & Arbuckle, T. E. (1997). Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *Am J Epidemiol*, 146(1), 32-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215221>
- Chanelles, O., Ducarme, G., Sifer, C., Hugues, J. N., Touboul, C., & Poncelet, C. (2011). Hydrosalpinx and infertility: what about conservative surgical management? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 159(1), 122-126. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.07.004
- Charles, G. D., Bartels, M. J., Zacharewski, T. R., Gollapudi, B. B., Freshour, N. L., & Carney, E. W. (2000). Activity of benzo[a]pyrene and its hydroxylated metabolites in an estrogen receptor-alpha reporter gene assay. *Toxicol Sci*, 55(2), 320-326. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828263>
- Chasalow, F. I., Blethen, S. L., Knight, S. M., & Taysi, K. (1986). 18q deletion syndrome in a child with steroid-17,20-lyase deficiency. *Steroids*, 47(6), 421-429. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3617117>
- Chatterjee, R. (2007). E-waste recycling spews dioxins into the air. *Environ Sci Technol*, 41(16), 5577. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17874754>
- Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B., & Willett, W. C. (2007). A prospective study of dairy foods intake and anovulatory infertility. *Hum Reprod*, 22(5), 1340-1347. doi:10.1093/humrep/dem019
- Checa Vizcaino, M. A., Corchado, A. R., Cuadri, M. E., Comadran, M. G., Brassesco, M., & Carreras, R. (2012). The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women. *Reprod Biomed Online*, 24(6), 606-610. doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.020
- Cherry, N., Moore, H., McNamee, R., Pacey, A., Burgess, G., Clyma, J. A., . . . participating centres of Chaps, U. K. (2008). Occupation and male infertility: glycol ethers and other exposures. *Occup Environ Med*, 65(10), 708-714. doi:10.1136/oem.2007.035824
- Chikuni, O., Polder, A., Skaare, J. U., & Nhachi, C. F. (1997). An evaluation of DDT and DDT residues in human breast milk in the Kariba Valley of Zimbabwe. *Bull Environ Contam Toxicol*, 58(5), 776-778. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115142>
- Chou, W. C., Chung, Y. T., Chen, H. Y., Wang, C. J., Ying, T. H., Chuang, C. Y., . . . Wang, S. L. (2014). Maternal arsenic exposure and DNA damage biomarkers, and the associations with birth outcomes in a general population from Taiwan. *PLoS One*, 9(2), e86398. doi:10.1371/journal.pone.0086398
- Chowdhury, A. R., Vachhrajani, K. D., & Chatterjee, B. B. (1985). Inhibition of 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase in rat testicular tissue by mercuric chloride. *Toxicol Lett*, 27(1-3), 45-49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3864291>
- Christin-Maitre, S., Ronci-Chaix, N., & Bouchard, P. (2002). [Ovary genes and molecular pathology]. *J Soc Biol*, 196(3), 207-216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462074>
- Chuang, C. C., Chen, C. D., Chao, K. H., Chen, S. U., Ho, H. N., & Yang, Y. S. (2003). Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 79(1), 63-68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524065>
- Darbre, P. D. (2006). Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J Appl Toxicol*, 26(3), 191-197. doi:10.1002/jat.1135
- Dasgupta, P., & Chellappan, S. P. (2006). Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story. *Cell Cycle*, 5(20), 2324-2328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17102610>

- Davey, J. C., Bodwell, J. E., Gosse, J. A., & Hamilton, J. W. (2007). Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol Sci*, 98(1), 75-86. doi:10.1093/toxsci/kfm013
- Davey, J. C., Nomikos, A. P., Wungjiranirun, M., Sherman, J. R., Ingram, L., Batki, C., . . . Hamilton, J. W. (2008). Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor-and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis. *Environ Health Perspect*, 116(2), 165-172. doi:10.1289/ehp.10131
- Davies, K. (2006). Strategies for eliminating and reducing persistent bioaccumulative toxic substances: common approaches, emerging trends, and level of success. *J Environ Health*, 69(5), 9-15, 36, 38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190337>
- de Jong, P. G., Kaandorp, S., Di Nisio, M., Goddijn, M., & Middeldorp, S. (2014). Aspirin and/or heparin for women with unexplained recurrent miscarriage with or without inherited thrombophilia. *Cochrane Database Syst Rev*, 7, CD004734. doi:10.1002/14651858.CD004734.pub4
- Dearth, R. K., Hiney, J. K., Srivastava, V., Les Dees, W., & Bratton, G. R. (2004). Low level lead (Pb) exposure during gestation and lactation: assessment of effects on pubertal development in Fisher 344 and Sprague-Dawley female rats. *Life Sci*, 74(9), 1139-1148. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687654>
- Dechaud, H., Bessueille, E., Bousquet, P. J., Reyftmann, L., Hamamah, S., & Hedon, B. (2008). Optimal timing of ultrasonographic and Doppler evaluation of uterine receptivity to implantation. *Reprod Biomed Online*, 16(3), 368-375. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18339259>
- Dehghani-Mohammadabadi, M., Salehi, M., Farifteh, F., Nematollahi, S., Arefian, E., Hajjarizadeh, A., . . . Nourmohammadi, Z. (2014). Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. *J Assist Reprod Genet*, 31(4), 453-461. doi:10.1007/s10815-014-0172-9
- Dejonckheere, W., Steurbaut, W., Drieghe, S., Verstraeten, R., & Braeckman, H. (1996). Monitoring of pesticide residues in fresh vegetables, fruits, and other selected food items in Belgium, 1991-1993. *J AOAC Int*, 79(1), 97-110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620117>
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 309-334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Denomme, M. M., White, C. R., Gillio-Meina, C., Macdonald, W. A., Deroo, B. J., Kidder, G. M., & Mann, M. R. (2012). Compromised fertility disrupts Peg1 but not Snrpn and Peg3 imprinted methylation acquisition in mouse oocytes. *Front Genet*, 3, 129. doi:10.3389/fgene.2012.00129
- Detmar, J., Rabaglino, T., Taniuchi, Y., Oh, J., Acton, B. M., Benito, A., . . . Jurisicova, A. (2006). Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. *Apoptosis*, 11(8), 1413-1425. doi:10.1007/s10495-006-8442-3
- Devreker, F., Hardy, K., Van den Bergh, M., Vannin, A. S., Emiliani, S., & Englert, Y. (2001). Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*, 16(4), 749-756. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278228>
- Devroey, P., Aboulghar, M., Garcia-Velasco, J., Griesinger, G., Humaidan, P., Kolibianakis, E., . . . Fauser, B. C. (2009). Improving the patient's experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod*, 24(4), 764-774. doi:10.1093/humrep/den468
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., . . . Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*, 30(4), 293-342. doi:10.1210/er.2009-0002

- Dickson, L. C., & Buzik, S. C. (1993). Health risks of "dioxins": a review of environmental and toxicological considerations. *Vet Hum Toxicol*, 35(1), 68-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8434461>
- Ding, G. L., Chen, X. J., Luo, Q., Dong, M. Y., Wang, N., & Huang, H. F. (2010). Attenuated oocyte fertilization and embryo development associated with altered growth factor/signal transduction induced by endometriotic peritoneal fluid. *Fertil Steril*, 93(8), 2538-2544. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.11.011
- Dipietromaria, A., Benayoun, B. A., Todeschini, A. L., Rivals, I., Bazin, C., & Veitia, R. A. (2009). Towards a functional classification of pathogenic FOXL2 mutations using transactivation reporter systems. *Hum Mol Genet*, 18(17), 3324-3333. doi:10.1093/hmg/ddp273
- Dixit, H., Rao, L., Padmalatha, V., Raseswari, T., Kapu, A. K., Panda, B., . . . Singh, L. (2010). Genes governing premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*, 20(6), 724-740. doi:10.1016/j.rbmo.2010.02.018
- Doherty, E., Pakarinen, P., Tiitinen, A., Kiilavuori, A., Huhtaniemi, I., Forrest, S., & Aittomäki, K. (2002). A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3), 1151-1155. doi:10.1210/jcem.87.3.8319
- Dong, W., Wang, L., Thornton, C., Scheffler, B. E., & Willett, K. L. (2008). Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. *Aquat Toxicol*, 88(4), 289-300. doi:10.1016/j.aquatox.2008.05.006
- Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2013). Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*, 9(12), 735-749. doi:10.1038/nrendo.2013.205
- Drevnick, P. E., & Sandheinrich, M. B. (2003). Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows. *Environ Sci Technol*, 37(19), 4390-4396. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572090>
- Duijkers, I. J., Klipping, C., Boerrigter, P. J., Machielsen, C. S., De Bie, J. J., & Voortman, G. (2002). Single dose pharmacokinetics and effects on follicular growth and serum hormones of a long-acting recombinant FSH preparation (FSH-CTP) in healthy pituitary-suppressed females. *Hum Reprod*, 17(8), 1987-1993. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151425>
- Dumollard, R., Duchon, M., & Carroll, J. (2007). The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol*, 77, 21-49. doi:10.1016/S0070-2153(06)77002-8
- Dunselman, G. A., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., . . . Embryology. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 29(3), 400-412. doi:10.1093/humrep/det457
- Dunson, D. B., Colombo, B., & Baird, D. D. (2002). Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 17(5), 1399-1403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980771>
- Ebisch, I. M., Thomas, C. M., Peters, W. H., Braat, D. D., & Steegers-Theunissen, R. P. (2007). The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update*, 13(2), 163-174. doi:10.1093/humupd/dml054
- Egawa, M., Yasuda, K., Nakajima, T., Okada, H., Yoshimura, T., Yuri, T., . . . Kanzaki, H. (2003). Smoking enhances oxytocin-induced rhythmic myometrial contraction. *Biol Reprod*, 68(6), 2274-2280. doi:10.1095/biolreprod.102.010785
- Ekart, J., McNatty, K., Hutton, J., & Pitman, J. (2013). Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Hum Reprod*, 28(11), 2930-2942. doi:10.1093/humrep/det357
- El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, A., Wen, S. W., & Walker, M. (2009). Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction. *Fertil Steril*, 92(5), 1557-1561. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.080



- Ellingsen, D. G., Efskind, J., Haug, E., Thomassen, Y., Martinsen, I., & Gaarder, P. I. (2000). Effects of low mercury vapour exposure on the thyroid function in chloralkali workers. *J Appl Toxicol*, 20(6), 483-489. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11180271>
- Ethics, E. T. F. o., Law, i., Dondorp, W., de Wert, G., Pennings, G., Shenfield, F., . . . Barri, P. (2010). Lifestyle-related factors and access to medically assisted reproduction. *Hum Reprod*, 25(3), 578-583. doi:10.1093/humrep/dep458
- Falorni, A., Brozzetti, A., Aglietti, M. C., Esposito, R., Minarelli, V., Morelli, S., . . . Marzotti, S. (2012). Progressive decline of residual follicle pool after clinical diagnosis of autoimmune ovarian insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 77(3), 453-458. doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04387.x
- Fanchin, R., Righini, C., Olivennes, F., Taylor, S., de Ziegler, D., & Frydman, R. (1998). Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 13(7), 1968-1974. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740459>
- Farhi, J., & Orvieto, R. (2009). Influence of smoking on outcome of COH and IUI in subfertile couples. *J Assist Reprod Genet*, 26(7), 421-424. doi:10.1007/s10815-009-9330-x
- Fausser, B. C., Devroey, P., Diedrich, K., Balaban, B., Bonduelle, M., Delemarre-van de Waal, H. A., . . . Evian Annual Reproduction Workshop, G. (2014). Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online*, 28(2), 162-182. doi:10.1016/j.rbmo.2013.10.013
- Fausser, B. C., Diedrich, K., Devroey, P., & Evian Annual Reproduction Workshop, G. (2008). Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*, 14(1), 1-14. doi:10.1093/humupd/dmm034
- Fausser, B. C., Mannaerts, B. M., Devroey, P., Leader, A., Boime, I., & Baird, D. T. (2009). Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update*, 15(3), 309-321. doi:10.1093/humupd/dmn065
- Feichtinger, W., Papalambrou, K., Poehl, M., Krischker, U., & Neumann, K. (1997). Smoking and in vitro fertilization: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*, 14(10), 596-599. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9447461>
- Felli, M., Martello, S., Marsili, R., & Chiarotti, M. (2005). Disappearance of cocaine from human hair after abstinence. *Forensic Sci Int*, 154(2-3), 96-98. doi:10.1016/j.forsciint.2004.09.113
- Fernandez-Salguero, P. M., Ward, J. M., Sundberg, J. P., & Gonzalez, F. J. (1997). Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol*, 34(6), 605-614. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396142>
- Fernando, S., Osianlis, T., Vollenhoven, B., Wallace, E., & Rombauts, L. (2014). A pilot double-blind randomised placebo-controlled dose-response trial assessing the effects of melatonin on infertility treatment (MIART): study protocol. *BMJ Open*, 4(8), e005986. doi:10.1136/bmjopen-2014-005986
- Ferrara, I., Balet, R., & Grudzinskas, J. G. (2000). Intrauterine donor insemination in single women and lesbian couples: a comparative study of pregnancy rates. *Hum Reprod*, 15(3), 621-625. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686208>
- Fertuck, K. C., Matthews, J. B., & Zacharewski, T. R. (2001). Hydroxylated benzo[a]pyrene metabolites are responsible for in vitro estrogen receptor-mediated gene expression induced by benzo[a]pyrene, but do not elicit uterotrophic effects in vivo. *Toxicol Sci*, 59(2), 231-240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158716>
- Filippi, F., Benaglia, L., Paffoni, A., Restelli, L., Vercellini, P., Somigliana, E., & Fedele, L. (2014). Ovarian endometriomas and oocyte quality: insights from in vitro

- fertilization cycles. *Fertil Steril*, 101(4), 988-993 e981. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.01.008
- Fiorini, C., Mograbi, B., Cronier, L., Bourget, I., Decrouy, X., Nebout, M., . . . Pointis, G. (2004). Dominant negative effect of connexin33 on gap junctional communication is mediated by connexin43 sequestration. *J Cell Sci*, 117(Pt 20), 4665-4672. doi:10.1242/jcs.01335
- Fluhr, H., Bischof-Islami, D., Krenzer, S., Licht, P., Bischof, P., & Zygmunt, M. (2008). Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril*, 90(4 Suppl), 1390-1395. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.08.023
- Ford, J. H., MacCormac, L., & Hiller, J. (1994). PALS (pregnancy and lifestyle study): association between occupational and environmental exposure to chemicals and reproductive outcome. *Mutat Res*, 313(2-3), 153-164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523900>
- Foster, W. G., Neal, M. S., Han, M. S., & Dominguez, M. M. (2008). Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 11(3-4), 162-176. doi:10.1080/10937400701873274
- Foxcroft, G. R., & Hunter, M. G. (1985). Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl*, 33, 1-19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003359>
- Freour, T., Masson, D., Mirallie, S., Jean, M., Bach, K., Dejoie, T., & Barriere, P. (2008). Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod Biomed Online*, 16(1), 96-102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18252054>
- Frery, N., Nessmann, C., Girard, F., Lafond, J., Moreau, T., Blot, P., . . . Huel, G. (1993). Environmental exposure to cadmium and human birthweight. *Toxicology*, 79(2), 109-118. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497864>
- Frey, K. A., Navarro, S. M., Kotelchuck, M., & Lu, M. C. (2008). The clinical content of preconception care: preconception care for men. *Am J Obstet Gynecol*, 199(6 Suppl 2), S389-395. doi:10.1016/j.ajog.2008.10.024
- Fride, E. (2008). Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 75-81. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01670.x
- Fujimoto, A., Morishima, K., Harada, M., Hirata, T., Osuga, Y., & Fujii, T. (2015). Elective single-embryo transfer improves cumulative pregnancy outcome in young patients but not in women of advanced reproductive age. *J Assist Reprod Genet*. doi:10.1007/s10815-015-0598-8
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P., Leter, G., . . . Spano, M. (2004). Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*, 19(6), 1409-1417. doi:10.1093/humrep/deh233
- Garcia-Algar, O., Kulaga, V., Gareri, J., Koren, G., Vall, O., Zuccaro, P., . . . Pichini, S. (2008). Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther Drug Monit*, 30(2), 249-254. doi:10.1097/FTD.0b013e31816a8657
- Garcia-Morales, P., Saceda, M., Kenney, N., Kim, N., Salomon, D. S., Gottardis, M. M., . . . Martin, M. B. (1994). Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 269(24), 16896-16901. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8207012>
- Gelbaya, T. A., Tsoumpou, I., & Nardo, L. G. (2010). The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 94(3), 936-945. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.04.003

- Genbacev, O., Bass, K. E., Joslin, R. J., & Fisher, S. J. (1995). Maternal smoking inhibits early human cytotrophoblast differentiation. *Reprod Toxicol*, 9(3), 245-255. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579909>
- Genbacev, O., & Miller, R. K. (2000). Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models--a review. *Placenta*, 21 Suppl A, S45-49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831121>
- Genbacev, O. D., Prakobphol, A., Foulk, R. A., Krtolica, A. R., Ilic, D., Singer, M. S., . . . Fisher, S. J. (2003). Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, 299(5605), 405-408. doi:10.1126/science.1079546
- George, V. K., Li, H., Teloken, C., Grignon, D. J., Lawrence, W. D., & Dhabuwala, C. B. (1996). Effects of long-term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. *J Urol*, 155(1), 327-331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7490880>
- Georgellis, A., Toppari, J., Veromaa, T., Rydstrom, J., & Parvinen, M. (1990). Inhibition of meiotic divisions of rat spermatocytes in vitro by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*, 231(2), 125-135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2117249>
- Gershon, E., Plaks, V., Aharon, I., Galiani, D., Reizel, Y., Sela-Abramovich, S., . . . Dekel, N. (2008). Oocyte-directed depletion of connexin43 using the Cre-LoxP system leads to subfertility in female mice. *Dev Biol*, 313(1), 1-12. doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.041
- Geva, E., Amit, A., Lerner-Geva, L., Azem, F., Yovel, I., & Lessing, J. B. (1995). Autoimmune disorders: another possible cause for in-vitro fertilization and embryo transfer failure. *Hum Reprod*, 10(10), 2560-2563. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567770>
- Gill, J. (2000). The effects of moderate alcohol consumption on female hormone levels and reproductive function. *Alcohol Alcohol*, 35(5), 417-423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022013>
- Gleicher, N., Liu, H. C., Dudkiewicz, A., Rosenwaks, Z., Kaberlein, G., Pratt, D., & Karande, V. (1994). Autoantibody profiles and immunoglobulin levels as predictors of in vitro fertilization success. *Am J Obstet Gynecol*, 170(4), 1145-1149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8166199>
- Gocze, P. M., Szabo, I., & Freeman, D. A. (1999). Influence of nicotine, cotinine, anabasine and cigarette smoke extract on human granulosa cell progesterone and estradiol synthesis. *Gynecol Endocrinol*, 13(4), 266-272. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10533162>
- Gochfeld, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf*, 56(1), 174-179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915150>
- Golub, M. S., Macintosh, M. S., & Baumrind, N. (1998). Developmental and reproductive toxicity of inorganic arsenic: animal studies and human concerns. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 1(3), 199-241. doi:10.1080/10937409809524552
- Goud, P. T., Goud, A. P., Joshi, N., Puscheck, E., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2014). Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 102(1), 151-159 e155. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.03.053
- Goverde, A. J., McDonnell, J., Vermeiden, J. P., Schats, R., Rutten, F. F., & Schoemaker, J. (2000). Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet*, 355(9197), 13-18. doi:10.1016/S0140-6736(99)04002-7
- Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., & Arcaro, K. F. (2004). Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive



- genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196(1), 58-67. doi:10.1016/j.taap.2003.12.003
- Gray, J. S. (2002). Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar Pollut Bull*, 45(1-12), 46-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12398366>
- Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M. G., . . . Tesarik, J. (2005). ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod*, 20(9), 2590-2594. doi:10.1093/humrep/dei091
- Greene, A. D., Patounakis, G., & Segars, J. H. (2014). Genetic associations with diminished ovarian reserve: a systematic review of the literature. *J Assist Reprod Genet*, 31(8), 935-946. doi:10.1007/s10815-014-0257-5
- Gregoraszczuk, E. L., & Ptak, A. (2013). Endocrine-Disrupting Chemicals: Some Actions of POPs on Female Reproduction. *Int J Endocrinol*, 2013, 828532. doi:10.1155/2013/828532
- Grimes, D. A. (1995). Validity of the postcoital test. *Am J Obstet Gynecol*, 172(4 Pt 1), 1327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7726286>
- Group, E. C. W. (2010). Europe the continent with the lowest fertility. *Hum Reprod Update*, 16(6), 590-602. doi:10.1093/humupd/dmq023
- Gruber, I., Just, A., Birner, M., & Losch, A. (2008). Effect of a woman's smoking status on oocyte, zygote, and day 3 pre-embryo quality in in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril*, 90(4), 1249-1252. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.108
- Guerrini, I., Jackson, S., & Keaney, F. (2009). Pregnancy and alcohol misuse. *BMJ*, 338, b845. doi:10.1136/bmj.b845
- Guillette, L. J., Jr., Crain, D. A., Rooney, A. A., & Pickford, D. B. (1995). Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 7, 157-164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593864>
- Gupta, P., Banker, M., Patel, P., & Joshi, B. (2012). A study of recipient related predictors of success in oocyte donation program. *J Hum Reprod Sci*, 5(3), 252-257. doi:10.4103/0974-1208.106336
- Guyen, M. A., Dilek, U., Pata, O., Dilek, S., & Ciragil, P. (2007). Prevalance of Chlamydia trochomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in the unexplained infertile women. *Arch Gynecol Obstet*, 276(3), 219-223. doi:10.1007/s00404-006-0279-z
- Guzick, D. S., Sullivan, M. W., Adamson, G. D., Cedars, M. I., Falk, R. J., Peterson, E. P., & Steinkampf, M. P. (1998). Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*, 70(2), 207-213. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696208>
- Hakim, R. B., Gray, R. H., & Zacur, H. (1998). Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility. *Fertil Steril*, 70(4), 632-637. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9797089>
- Haller, K., Sarapik, A., Talja, I., Salumets, A., & Uibo, R. (2006). Controlled ovarian hyperstimulation changes the prevalence of serum autoantibodies in in vitro fertilization patients. *Am J Reprod Immunol*, 56(5-6), 364-370. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00438.x
- Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Leveille, M. C., Leader, A., & Sirard, M. A. (2010). Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. *Mol Hum Reprod*, 16(8), 548-556. doi:10.1093/molehr/gaq051
- Hardarson, T., Hanson, C., Sjogren, A., & Lundin, K. (2001). Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for

- aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*, 16(2), 313-318. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157826>
- Harvey, A. J., Kind, K. L., & Thompson, J. G. (2004). Effect of the oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol on hypoxia-inducible factor-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev*, 16(7), 665-673. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15740689>
- Hasegawa, A., Kumamoto, K., Mochida, N., Komori, S., & Koyama, K. (2009). Gene expression profile during ovarian folliculogenesis. *J Reprod Immunol*, 83(1-2), 40-44. doi:10.1016/j.jri.2009.09.002
- Hassa, H., Gurer, F., Tanir, H. M., Kaya, M., Gunduz, N. B., Sariboyaci, A. E., & Bal, C. (2007). Effect of cigarette smoke and alpha-tocopherol (vitamin E) on fertilization, cleavage, and embryo development rates in mice: an experimental in vitro fertilization mice model study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 135(2), 177-182. doi:10.1016/j.ejogrb.2007.05.020
- Hassan, M. A., & Killick, S. R. (2004). Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril*, 81(2), 384-392. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.06.027
- He, R. H., Gao, H. J., Li, Y. Q., & Zhu, X. M. (2010). The associated factors to endometrial cavity fluid and the relevant impact on the IVF-ET outcome. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 46. doi:10.1186/1477-7827-8-46
- Henderson, G. L. (1993). Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int*, 63(1-3), 19-29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138221>
- Henkel, R. (2012). Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*, 14(2), 260-269. doi:10.1038/aja.2011.133
- Henson, M. C., & Chedrese, P. J. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229(5), 383-392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096650>
- Herrero, J., Tejera, A., Albert, C., Vidal, C., de los Santos, M. J., & Meseguer, M. (2013). A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril*, 100(6), 1602-1609 e1601-1604. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.033
- Hickey, J. J., & Anderson, D. W. (1968). Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science*, 162(3850), 271-273. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4877438>
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(2), 101-123. doi:10.1080/10408390500400009
- Hjollund, N. H., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Henriksen, T. B., Andersson, A. M., Kolstad, H. A., . . . Olsen, J. (2000). [Stress and fertility. A follow-up study among couples planning the first pregnancy]. *Ugeskr Laeger*, 162(38), 5081-5086. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014139>
- Hoek, A., Schoemaker, J., & Drexhage, H. A. (1997). Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev*, 18(1), 107-134. doi:10.1210/edrv.18.1.0291
- Holmes, P., James, K. A., & Levy, L. S. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci Total Environ*, 408(2), 171-182. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.09.043
- Holt, J. E., Pye, V., Boon, E., Stewart, J. L., Garcia-Higuera, I., Moreno, S., . . . McLaughlin, E. A. (2014). The APC/C activator FZR1 is essential for meiotic prophase I in mice. *Development*, 141(6), 1354-1365. doi:10.1242/dev.104828
- Homan, G. F., Davies, M., & Norman, R. (2007). The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing



- infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update*, 13(3), 209-223. doi:10.1093/humupd/dml056
- Hoof, K. (2007). [Pelvic inflammatory disease]. *Ther Umsch*, 64(7), 365-368. doi:10.1024/0040-5930.64.7.365
- Hoozemans, D. A., Schats, R., Lambalk, N. B., Homburg, R., & Hompes, P. G. (2008). Serial uterine artery Doppler velocity parameters and human uterine receptivity in IVF/ICSI cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 31(4), 432-438. doi:10.1002/uog.5179
- Horiguchi, T., Hyeon-Seo, C., Shiraishi, H., Shibata, Y., Soma, M., Morita, M., & Shimizu, M. (1998). Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci Total Environ*, 214, 65-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9646517>
- Host, E., Lindenberg, S., Kahn, J. A., & Christensen, F. (1999). DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 78(4), 336-339. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203303>
- Houghton, F. D., Hawkhead, J. A., Humpherson, P. G., Hogg, J. E., Balen, A. H., Rutherford, A. J., & Leese, H. J. (2002). Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*, 17(4), 999-1005. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11925397>
- Howles, C. M., Kim, C. H., & Elder, K. (2006). Treatment strategies in assisted reproduction for women of advanced maternal age. *Int Surg*, 91(5 Suppl), S37-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17436604>
- Hughes, C., & Association of Clinical, E. (2012). Association of clinical embryologists - guidelines on good practice in clinical embryology laboratories 2012. *Hum Fertil (Camb)*, 15(4), 174-189. doi:10.3109/14647273.2012.747891
- Hughes, E. G. (1997). The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod*, 12(9), 1865-1872. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363697>
- Hughes, E. G., & Brennan, B. G. (1996). Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertil Steril*, 66(5), 679-689. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893667>
- Hulse, G. K., Milne, E., English, D. R., & Holman, C. D. (1998). Assessing the relationship between maternal opiate use and antepartum haemorrhage. *Addiction*, 93(10), 1553-1558. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926560>
- Humaidan, P., Bungum, L., Bungum, M., Hald, F., Agerholm, I., Blaabjerg, J., . . . Lindenberg, S. (2005). Reproductive outcome using a GnRH antagonist (cetorelix) for luteolysis and follicular synchronization in poor responder IVF/ICSI patients treated with a flexible GnRH antagonist protocol. *Reprod Biomed Online*, 11(6), 679-684. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16417730>
- Humaidan, P., Quartarolo, J., & Papanikolaou, E. G. (2010). Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil Steril*, 94(2), 389-400. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.03.028
- Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., & Holland, M. K. (2006). Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod*, 12(2), 61-69. doi:10.1093/molehr/gal010
- Iavicoli, I., Fontana, L., & Bergamaschi, A. (2009). The effects of metals as endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 12(3), 206-223. doi:10.1080/10937400902902062
- Imamovic Kumalic, S., & Pinter, B. (2014). Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Biomed Res Int*, 2014, 426951. doi:10.1155/2014/426951

- International Committee for Monitoring Assisted Reproductive, T., de Mouzon, J., Lancaster, P., Nygren, K. G., Sullivan, E., Zegers-Hochschild, F., . . . Adamson, D. (2009). World collaborative report on Assisted Reproductive Technology, 2002. *Hum Reprod*, 24(9), 2310-2320. doi:10.1093/humrep/dep098
- Inyang, F., Ramesh, A., Kopsombut, P., Niaz, M. S., Hood, D. B., Nyanda, A. M., & Archibong, A. E. (2003). Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol*, 17(5), 527-537. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555190>
- Jaddoe, V. W., Troe, E. J., Hofman, A., Mackenbach, J. P., Moll, H. A., Steegers, E. A., & Witteman, J. C. (2008). Active and passive maternal smoking during pregnancy and the risks of low birthweight and preterm birth: the Generation R Study. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 22(2), 162-171. doi:10.1111/j.1365-3016.2007.00916.x
- Jaiswar, S. P., Natu, S. M., Sujata, Sankhwar, P. L., & Manjari, G. (2015). Prediction of Poor Ovarian response by Biochemical and Biophysical Markers: A Logistic Regression Model. *J Obstet Gynaecol India*, 65(6), 411-416. doi:10.1007/s13224-014-0639-8
- Jakszyn, P., Goni, F., Etzeandia, A., Vives, A., Millan, E., Lopez, R., . . . Agudo, A. (2009). Serum levels of organochlorine pesticides in healthy adults from five regions of Spain. *Chemosphere*, 76(11), 1518-1524. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.048
- Jana, K., Jana, S., & Samanta, P. K. (2006). Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 9. doi:10.1186/1477-7827-4-9
- Jaroudi, K., Al-Hassan, S., Al-Sufayan, H., Al-Mayman, H., Qeba, M., & Coskun, S. (2003). Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization are complementary techniques in management of unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet*, 20(9), 377-381. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14531649>
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., & Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*, 24 Suppl 1, 1-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569444>
- Jensen, T. K., Hjollund, N. H., Henriksen, T. B., Scheike, T., Kolstad, H., Giwercman, A., . . . Olsen, J. (1998). Does moderate alcohol consumption affect fertility? Follow up study among couples planning first pregnancy. *BMJ*, 317(7157), 505-510. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712595>
- Johnson, K., Posner, S. F., Biermann, J., Cordero, J. F., Atrash, H. K., Parker, C. S., . . . Select Panel on Preconception, C. (2006). Recommendations to improve preconception health and health care--United States. A report of the CDC/ATSDR Preconception Care Work Group and the Select Panel on Preconception Care. *MMWR Recomm Rep*, 55(RR-6), 1-23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16617292>
- Johnson, M. D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., . . . Martin, M. B. (2003). Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med*, 9(8), 1081-1084. doi:10.1038/nm902
- Johnson, N., van Voorst, S., Sowter, M. C., Strandell, A., & Mol, B. W. (2010). Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD002125. doi:10.1002/14651858.CD002125.pub3
- Jolibois, L. S., Jr., Burow, M. E., Swan, K. F., George, W. J., Anderson, M. B., & Henson, M. C. (1999). Effects of cadmium cell viability, trophoblastic development, and expression of low density lipoprotein receptor transcripts in cultured human placental cells. *Reprod Toxicol*, 13(6), 473-480. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613395>

- Jolibois, L. S., Jr., Shi, W., George, W. J., Henson, M. C., & Anderson, M. B. (1999). Cadmium accumulation and effects on progesterone release by cultured human trophoblast cells. *Reprod Toxicol*, 13(3), 215-221. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10378470>
- Juhl, M., Nyboe Andersen, A. M., Gronbaek, M., & Olsen, J. (2001). Moderate alcohol consumption and waiting time to pregnancy. *Hum Reprod*, 16(12), 2705-2709. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726599>
- Juriscova, A., Taniuchi, A., Li, H., Shang, Y., Antenos, M., Detmar, J., . . . Casper, R. F. (2007). Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *J Clin Invest*, 117(12), 3971-3978. doi:10.1172/JCI28493
- Kalab, P., Kopf, G. S., & Schultz, R. M. (1991). Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation and egg activation: effects of newborn calf serum and fetuin. *Biol Reprod*, 45(5), 783-787. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1721844>
- Kaltreider, R. C., Davis, A. M., Lariviere, J. P., & Hamilton, J. W. (2001). Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ Health Perspect*, 109(3), 245-251. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11333185>
- Kalu, E., & Panay, N. (2008). Spontaneous premature ovarian failure: management challenges. *Gynecol Endocrinol*, 24(5), 273-279. doi:10.1080/09513590801990764
- Kamel, R. M. (2010). Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 21. doi:10.1186/1477-7827-8-21
- Karaer, A., Avsar, F. A., & Batioglu, S. (2006). Risk factors for ectopic pregnancy: a case-control study. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 46(6), 521-527. doi:10.1111/j.1479-828X.2006.00653.x
- Karchner, S. I., Franks, D. G., Kennedy, S. W., & Hahn, M. E. (2006). The molecular basis for differential dioxin sensitivity in birds: role of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(16), 6252-6257. doi:10.1073/pnas.0509950103
- Kasperczyk, A., Kasperczyk, S., Horak, S., Ostalowska, A., Grucka-Mamczar, E., Romuk, E., . . . Birkner, E. (2008). Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol Appl Pharmacol*, 228(3), 378-384. doi:10.1016/j.taap.2007.12.024
- Katz-Jaffe, M. G., & Gardner, D. K. (2008). Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? *Reprod Biomed Online*, 17(4), 497-501. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854102>
- Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., . . . Endometrium Guideline Development, G. (2005). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*, 20(10), 2698-2704. doi:10.1093/humrep/dei135
- Khan, N. I., Owens, G., Bruce, D., & Naidu, R. (2009). Human arsenic exposure and risk assessment at the landscape level: a review. *Environ Geochem Health*, 31 Suppl 1, 143-166. doi:10.1007/s10653-008-9240-3
- Khorram, O., Han, G., & Magee, T. (2010). Cigarette smoke inhibits endometrial epithelial cell proliferation through a nitric oxide-mediated pathway. *Fertil Steril*, 93(1), 257-263. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.09.074
- Khoudja, R. Y., Xu, Y., Li, T., & Zhou, C. (2013). Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *J Assist Reprod Genet*, 30(1), 69-76. doi:10.1007/s10815-012-9900-1
- Kitajima, M., Khan, K. N., Fujishita, A., Masuzaki, H., Koji, T., & Ishimaru, T. (2004). Expression of the arylhydrocarbon receptor in the peri-implantation period of the



- mouse uterus and the impact of dioxin on mouse implantation. *Arch Histol Cytol*, 67(5), 465-474. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781987>
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 215-220. doi:10.1016/j.taap.2009.03.026
- Klonoff-Cohen, H., Bleha, J., & Lam-Kruglick, P. (2002). A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum Reprod*, 17(7), 1746-1754. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093834>
- Klonoff-Cohen, H., Lam-Kruglick, P., & Gonzalez, C. (2003). Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril*, 79(2), 330-339. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12568842>
- Klonoff-Cohen, H., Natarajan, L., Marrs, R., & Yee, B. (2001). Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum Reprod*, 16(7), 1382-1390. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425817>
- Knight, C. A., Knight, I., Mitchell, D. C., & Zepp, J. E. (2004). Beverage caffeine intake in US consumers and subpopulations of interest: estimates from the Share of Intake Panel survey. *Food Chem Toxicol*, 42(12), 1923-1930. doi:10.1016/j.fct.2004.05.002
- Knoll, M., & Talbot, P. (1998). Cigarette smoke inhibits oocyte cumulus complex pick-up by the oviduct in vitro independent of ciliary beat frequency. *Reprod Toxicol*, 12(1), 57-68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431573>
- Koning, A. M., Mutsaerts, M. A., Kuchenbecker, W. K., Broekmans, F. J., Land, J. A., Mol, B. W., & Hoek, A. (2012). Complications and outcome of assisted reproduction technologies in overweight and obese women. *Hum Reprod*, 27(2), 457-467. doi:10.1093/humrep/der416
- Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect*, 115 Suppl 1, 98-105. doi:10.1289/ehp.9357
- Kovalevsky, G., & Patrizio, P. (2005). High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril*, 84(2), 325-330. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.04.020
- Koyama, K., Hasegawa, A., Mochida, N., & Calongos, G. (2005). Follicular dysfunction induced by autoimmunity to zona pellucida. *Reprod Biol*, 5(3), 269-278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16372044>
- Kronstrand, R., Forsman, M., & Roman, M. (2013). A screening method for 30 drugs in hair using ultrahigh-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Ther Drug Monit*, 35(3), 288-295. doi:10.1097/FTD.0b013e3182884528
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., . . . Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252-4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216
- Kunz, G., & Leyendecker, G. (2002). Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction. *Reprod Biomed Online*, 4 Suppl 3, 5-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470555>
- Kupka, M. S., Ferraretti, A. P., de Mouzon, J., Erb, K., D'Hooghe, T., Castilla, J. A., . . . Embryology. (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod*, 29(10), 2099-2113. doi:10.1093/humrep/deu175

- LaCombe, J., & Ginsburg, F. (2003). Adnexal torsion in a patient with hydrosalpinx who underwent tubal occlusion before in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 79(2), 437-438. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12568862>
- Lacroix, A., & Hontela, A. (2006). Role of calcium channels in cadmium-induced disruption of cortisol synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 144(2), 141-147. doi:10.1016/j.cbpc.2006.07.008
- Lafuente, A., Cano, P., & Esquifino, A. (2003). Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent? *Biometals*, 16(2), 243-250. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12572682>
- Lahteenmaki, A., Veilahti, J., & Hovatta, O. (1995). Intra-uterine insemination versus cyclic, low-dose prednisolone in couples with male antisperm antibodies. *Hum Reprod*, 10(1), 142-147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7745044>
- Lala, P. K., & Chakraborty, C. (2003). Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*, 24(6), 575-587. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828917>
- Lamas, C., Chambry, J., Nicolas, I., Frydman, R., Jeammet, P., & Corcos, M. (2006). Alexithymia in infertile women. *J Psychosom Obstet Gynaecol*, 27(1), 23-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16752873>
- Lass, A., Skull, J., McVeigh, E., Margara, R., & Winston, R. M. (1997). Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod*, 12(2), 294-297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9070714>
- Lee, E., Illingworth, P., Wilton, L., & Chambers, G. M. (2015). The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Hum Reprod*, 30(2), 473-483. doi:10.1093/humrep/deu303
- Leon-Olea, M., Martyniuk, C. J., Orlando, E. F., Ottinger, M. A., Rosenfeld, C. S., Wolstenholme, J. T., & Trudeau, V. L. (2014). Current concepts in neuroendocrine disruption. *Gen Comp Endocrinol*, 203, 158-173. doi:10.1016/j.ygcen.2014.02.005
- Leonards, P. E., van Hattum, B., & Leslie, H. (2008). Assessing the risks of persistent organic pollutants to top predators: a review of approaches. *Integr Environ Assess Manag*, 4(4), 386-398. doi:10.1897/IEAM\_2008-008.1
- Leoni, G., Bogliolo, L., Deiana, G., Berlinguer, F., Rosati, I., Pintus, P. P., . . . Naitana, S. (2002). Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol*, 16(4), 371-377. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220597>
- Lessov-Schlaggar, C. N., Benowitz, N. L., Jacob, P., & Swan, G. E. (2009). Genetic influences on individual differences in nicotine glucuronidation. *Twin Res Hum Genet*, 12(5), 507-513. doi:10.1375/twin.12.5.507
- Levens, E. D., Whitcomb, B. W., Hennessy, S., James, A. N., Yauger, B. J., & Larsen, F. W. (2008). Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril*, 90(6), 2138-2143. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.029
- Leviton, A., & Cowan, L. (2002). A review of the literature relating caffeine consumption by women to their risk of reproductive hazards. *Food Chem Toxicol*, 40(9), 1271-1310. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204391>
- Liem, A. K., Furst, P., & Rappe, C. (2000). Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit Contam*, 17(4), 241-259. doi:10.1080/026520300283324
- Lienesch, L. A., Dumont, J. N., & Bantle, J. A. (2000). The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 41(10), 1651-1658. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057693>

- Liu, J., Xie, Y., Cooper, R., Ducharme, D. M., Tennant, R., Diwan, B. A., & Waalkes, M. P. (2007). Transplacental exposure to inorganic arsenic at a hepatocarcinogenic dose induces fetal gene expression changes in mice indicative of aberrant estrogen signaling and disrupted steroid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220(3), 284-291. doi:10.1016/j.taap.2007.01.018
- Liu, Y., Li, G. P., Sessions, B. R., Rickords, L. F., White, K. L., & Bunch, T. D. (2008). Nicotine induces multinuclear formation and causes aberrant embryonic development in bovine. *Mol Reprod Dev*, 75(5), 801-809. doi:10.1002/mrd.20774
- Liu, Y., Li, G. P., White, K. L., Rickords, L. F., Sessions, B. R., Aston, K. I., & Bunch, T. D. (2007). Nicotine alters bovine oocyte meiosis and affects subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev*, 74(11), 1473-1482. doi:10.1002/mrd.20717
- Loret De Mola, J. R., Garside, W. T., Bucci, J., Tureck, R. W., & Heyner, S. (1997). Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet*, 14(6), 332-336. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226512>
- Lukaszuk, K., Liss, J., Kunicki, M., Jakiel, G., Wasniewski, T., Woclawek-Potocka, I., & Pastuszek, E. (2014). Anti-Mullerian hormone (AMH) is a strong predictor of live birth in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol*, 14(3), 176-181. doi:10.1016/j.repbio.2014.03.004
- Luke, B., Brown, M. B., Morbeck, D. E., Hudson, S. B., Coddington, C. C., 3rd, & Stern, J. E. (2010). Factors associated with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and its effect on assisted reproductive technology (ART) treatment and outcome. *Fertil Steril*, 94(4), 1399-1404. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.092
- Lutterodt, M. C., Rosendahl, M., Yding Andersen, C., Skouby, S. O., & Byskov, A. G. (2009). Age determination enhanced by embryonic foot bud and foot plate measurements in relation to Carnegie stages, and the influence of maternal cigarette smoking. *Hum Reprod*, 24(8), 1825-1833. doi:10.1093/humrep/dep176
- Luzardo, O. P., Mahtani, V., Troyano, J. M., Alvarez de la Rosa, M., Padilla-Perez, A. I., Zumbado, M., . . . Boada, L. D. (2009). Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). *Environ Res*, 109(5), 607-613. doi:10.1016/j.envres.2009.03.008
- Lyons, E. A., Taylor, P. J., Zheng, X. H., Ballard, G., Levi, C. S., & Kredentser, J. V. (1991). Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women. *Fertil Steril*, 55(4), 771-774. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010002>
- Magli, M. C., Van den Abbeel, E., Lundin, K., Royere, D., Van der Elst, J., Gianaroli, L., & Committee of the Special Interest Group on, E. (2008). Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod*, 23(6), 1253-1262. doi:10.1093/humrep/den068
- Mailhes, J. B., Young, D., Caldito, G., & London, S. N. (2000). Sensitivity of mouse oocytes to nicotine-induced perturbations during oocyte meiotic maturation and aneuploidy in vivo and in vitro. *Mol Hum Reprod*, 6(3), 232-237. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694270>
- Malchau, S. S., Loft, A., Henningsen, A. K., Nyboe Andersen, A., & Pinborg, A. (2014). Perinatal outcomes in 6,338 singletons born after intrauterine insemination in Denmark, 2007 to 2012: the influence of ovarian stimulation. *Fertil Steril*, 102(4), 1110-1116 e1112. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.034
- Mandal, P. K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B*, 175(4), 221-230. doi:10.1007/s00360-005-0483-3
- Mande, P. V., Parikh, F. R., Hinduja, I., Zaveri, K., Vaidya, R., Gajbhiye, R., & Khole, V. V. (2011). Identification and validation of candidate biomarkers involved in human

- ovarian autoimmunity. *Reprod Biomed Online*, 23(4), 471-483. doi:10.1016/j.rbmo.2011.06.013
- Marchetti, C. (2003). Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotox Res*, 5(3), 221-236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835126>
- Mariussen, E., & Fonnum, F. (2006). Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update. *Crit Rev Toxicol*, 36(3), 253-289. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16686424>
- Marrs, R., Meldrum, D., Muasher, S., Schoolcraft, W., Werlin, L., & Kelly, E. (2004). Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod Biomed Online*, 8(2), 175-182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14989794>
- Marshburn, P. B. (2015). Counseling and diagnostic evaluation for the infertile couple. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 42(1), 1-14. doi:10.1016/j.ogc.2014.10.001
- Martin, J. G., & Festa-Bianchet, M. (2011). Age-independent and age-dependent decreases in reproduction of females. *Ecol Lett*, 14(6), 576-581. doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01621.x
- Martins, L. F., Yegles, M., Thieme, D., & Wennig, R. (2008). Influence of bleaching on the enantiomeric disposition of amphetamine-type stimulants in hair. *Forensic Sci Int*, 176(1), 38-41. doi:10.1016/j.forsciint.2007.06.023
- Matikainen, T., Perez, G. I., Jurisicova, A., Pru, J. K., Schlezinger, J. J., Ryu, H. Y., . . . Tilly, J. L. (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*, 28(4), 355-360. doi:10.1038/ng575
- Matorras, R., Rodriguez, F., Pijoan, J. I., Etxanojauregui, A., Neyro, J. L., Elorriaga, M. A., & Rodriguez-Escudero, F. J. (2001). Women who are not exposed to spermatozoa and infertile women have similar rates of stage I endometriosis. *Fertil Steril*, 76(5), 923-928. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704112>
- Matsumoto, E., Kawanaka, Y., Yun, S. J., & Oyaizu, H. (2009). Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(2), 205-216. doi:10.1007/s00253-009-2094-5
- Mattioli, M., Galeati, G., Barboni, B., & Seren, E. (1994). Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*, 100(2), 403-409. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021856>
- Mattison, D. R., Singh, H., Takizawa, K., & Thomford, P. J. (1989). Ovarian toxicity of benzo(a)pyrene and metabolites in mice. *Reprod Toxicol*, 3(2), 115-125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2485204>
- Mattison, D. R., & Thorgeirsson, S. S. (1978). Smoking and industrial pollution, and their effects on menopause and ovarian cancer. *Lancet*, 1(8057), 187-188. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/74610>
- McCarty, L. S., & Borgert, C. J. (2006). Review of the toxicity of chemical mixtures containing at least one organochlorine. *Regul Toxicol Pharmacol*, 45(2), 104-118. doi:10.1016/j.yrtph.2006.03.002
- McDiarmid, M. A., Gardiner, P. M., & Jack, B. W. (2008). The clinical content of preconception care: environmental exposures. *Am J Obstet Gynecol*, 199(6 Suppl 2), S357-361. doi:10.1016/j.ajog.2008.10.044
- McGovern, P. G., Myers, E. R., Silva, S., Coutifaris, C., Carson, S. A., Legro, R. S., . . . Network, N. N. C. R. M. (2004). Absence of secretory endometrium after false-positive home urine luteinizing hormone testing. *Fertil Steril*, 82(5), 1273-1277. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.03.070

- Meller, W., Burns, L. H., Crow, S., & Grambsch, P. (2002). Major depression in unexplained infertility. *J Psychosom Obstet Gynaecol*, 23(1), 27-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061034>
- Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M., Moreno-Grau, J. M., Ten, J., Roca, M., Moreno-Grau, S., & Bernabeu, R. (2008). Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reprod Biomed Online*, 16(6), 842-850. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549695>
- Mendola, P., Messer, L. C., & Rappazzo, K. (2008). Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril*, 89(2 Suppl), e81-94. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.12.036
- Mendoza, N., Julia, M. D., Galliano, D., Coronado, P., Diaz, B., Fontes, J., . . . Sanchez-Borrego, R. (2015). Spanish consensus on premature menopause. *Maturitas*, 80(2), 220-225. doi:10.1016/j.maturitas.2014.11.007
- Menken, J., Trussell, J., & Larsen, U. (1986). Age and infertility. *Science*, 233(4771), 1389-1394. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3755843>
- Merce, L. T., Barco, M. J., Bau, S., & Troyano, J. (2008). Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome? *Fertil Steril*, 89(1), 111-117. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.029
- Mercer, B. A., Wallace, A. M., Brinckerhoff, C. E., & D'Armiento, J. M. (2009). Identification of a cigarette smoke-responsive region in the distal MMP-1 promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40(1), 4-12. doi:10.1165/rcmb.2007-0310OC
- Meroni, P. L., Chighizola, C. B., Rovelli, F., & Gerosa, M. (2014). Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Res Ther*, 16(2), 209. doi:10.1186/ar4549
- Meseguer, M., Tejera, A., Hilligsoe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohi, J. (2011). The use of s as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, 26(10), 2658-2671. doi:10.1093/humrep/der256
- Miller, E. K., Vanarsdale, A., Keeler, G. J., Chalmers, A., Poissant, L., Kamman, N. C., & Brulotte, R. (2005). Estimation and mapping of wet and dry mercury deposition across northeastern North America. *Ecotoxicology*, 14(1-2), 53-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931958>
- Mlynarcikova, A., Kolena, J., Fickova, M., & Scsukova, S. (2005). Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate. *Mol Cell Endocrinol*, 244(1-2), 57-62. doi:10.1016/j.mce.2005.02.009
- Mochtar, M. H., Van der, V., Ziech, M., & van Wely, M. (2007). Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD005070. doi:10.1002/14651858.CD005070.pub2
- Mollo, A., De Franciscis, P., Colacurci, N., Cobellis, L., Perino, A., Venezia, R., . . . De Placido, G. (2009). Hysteroscopic resection of the septum improves the pregnancy rate of women with unexplained infertility: a prospective controlled trial. *Fertil Steril*, 91(6), 2628-2631. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.04.011
- Moor, R. M., Dai, Y., Lee, C., & Fulka, J., Jr. (1998). Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update*, 4(3), 223-236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741707>
- Morris, I. D., Iltott, S., Dixon, L., & Brison, D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, 17(4), 990-998. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11925396>



- Mortimer, D. (2000). Sperm preparation methods. *J Androl*, 21(3), 357-366. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819443>
- Moutou, C., Goossens, V., Coonen, E., De Rycke, M., Kokkali, G., Renwick, P., . . . Traeger-Synodinos, J. (2014). ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum Reprod*, 29(5), 880-903. doi:10.1093/humrep/deu012
- Moyle, P. L., Kataoka, M. Y., Nakai, A., Takahata, A., Reinhold, C., & Sala, E. (2010). Nonovarian cystic lesions of the pelvis. *Radiographics*, 30(4), 921-938. doi:10.1148/rg.304095706
- Mueller, B. A., Daling, J. R., Weiss, N. S., & Moore, D. E. (1990). Recreational drug use and the risk of primary infertility. *Epidemiology*, 1(3), 195-200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081252>
- Mukherjee, R. A., Hollins, S., Abou-Saleh, M. T., & Turk, J. (2005). Low level alcohol consumption and the fetus. *BMJ*, 330(7488), 375-376. doi:10.1136/bmj.330.7488.375
- Mulders, A. G., Laven, J. S., Eijkemans, M. J., Hughes, E. G., & Fauser, B. C. (2003). Patient predictors for outcome of gonadotrophin ovulation induction in women with normogonadotrophic anovulatory infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 9(5), 429-449. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640376>
- Munne, S., Dailey, T., Sultan, K. M., Grifo, J., & Cohen, J. (1995). The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod*, 10(4), 1014-1020. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650111>
- Musshoff, F., & Madea, B. (2007). Analytical pitfalls in hair testing. *Anal Bioanal Chem*, 388(7), 1475-1494. doi:10.1007/s00216-007-1288-x
- Muthusami, K. R., & Chinnaswamy, P. (2005). Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril*, 84(4), 919-924. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.04.025
- Nair, A. K., & Menon, K. M. (2005). Regulation of luteinizing hormone receptor expression: evidence of translational suppression in vitro by a hormonally regulated mRNA-binding protein and its endogenous association with luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary. *J Biol Chem*, 280(52), 42809-42816. doi:10.1074/jbc.M503154200
- Nakamoto, T., Yasuda, K., Yasuhara, M., Nakajima, T., Mizokami, T., Okada, H., & Kanzaki, H. (2006). Cigarette smoke extract enhances oxytocin-induced rhythmic contractions of rat and human preterm myometrium. *Reproduction*, 132(2), 343-353. doi:10.1530/rep.1.00908
- Nampoothiri, L. P., Agarwal, A., & Gupta, S. (2007). Effect of co-exposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulosa cells. *Arch Toxicol*, 81(3), 145-150. doi:10.1007/s00204-006-0133-x
- Nasreddine, L., & Parent-Massin, D. (2002). Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicol Lett*, 127(1-3), 29-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052638>
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam*, 20(1), 1-30. doi:10.1080/0265203021000007840
- Neal, M. S., Zhu, J., & Foster, W. G. (2008). Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reprod Toxicol*, 25(1), 100-106. doi:10.1016/j.reprotox.2007.10.012
- Neal, M. S., Zhu, J., Holloway, A. C., & Foster, W. G. (2007). Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay. *Hum Reprod*, 22(4), 961-967. doi:10.1093/humrep/del487

- Nesatyy, V. J., Rutishauser, B. V., Eggen, R. I., & Suter, M. J. (2005). Identification of the estrogen receptor Cd-binding sites by chemical modification. *Analyst*, 130(7), 1087-1097. doi:10.1039/b501192b
- Ng, E. H., Chan, C. C., Tang, O. S., Yeung, W. S., & Ho, P. C. (2007). Endometrial and subendometrial vascularity is higher in pregnant patients with livebirth following ART than in those who suffer a miscarriage. *Hum Reprod*, 22(4), 1134-1141. doi:10.1093/humrep/del458
- Nizard, J., Guettrot-Imbert, G., Plu-Bureau, G., Ciangura, C., Jacqueminet, S., Leenhardt, L., . . . Costedoat-Chalumeau, N. (2014). [Chronic maternal diseases and pregnancy losses. French guidelines.]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 43(10), 865-882. doi:10.1016/j.jgyn.2014.09.017
- O'Flaherty, E. J. (1998). A physiologically based kinetic model for lead in children and adults. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 6, 1495-1503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9860908>
- Oehninger, S., & Gosden, R. G. (2002). Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? No, not in light of the scientific data. *Hum Reprod*, 17(9), 2237-2242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202408>
- Oei, S. G., Helmerhorst, F. M., Bloemenkamp, K. W., Hollants, F. A., Meerpoel, D. E., & Keirse, M. J. (1998). Effectiveness of the postcoital test: randomised controlled trial. *BMJ*, 317(7157), 502-505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712594>
- Oktaý, K., Turan, V., Bedoschi, G., Pacheco, F. S., & Moy, F. (2015). Fertility Preservation Success Subsequent to Concurrent Aromatase Inhibitor Treatment and Ovarian Stimulation in Women With Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 33(22), 2424-2429. doi:10.1200/JCO.2014.59.3723
- Olsen, J., Bolumar, F., Boldsen, J., & Bisanti, L. (1997). Does moderate alcohol intake reduce fecundability? A European multicenter study on infertility and subfecundity. European Study Group on Infertility and Subfecundity. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(2), 206-212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113254>
- Omland, A. K., Abyholm, T., Fedorcsak, P., Ertzeid, G., Oldereid, N. B., Bjercke, S., & Tanbo, T. (2005). Pregnancy outcome after IVF and ICSI in unexplained, endometriosis-associated and tubal factor infertility. *Hum Reprod*, 20(3), 722-727. doi:10.1093/humrep/deh664
- Or, Y., & Shoham, Z. (2006). Ovarian stimulation in polycystic ovarian syndrome. *Int Surg*, 91(5 Suppl), S25-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17436602>
- Orio, F., & Palomba, S. (2014). Reproductive endocrinology: New guidelines for the diagnosis and treatment of PCOS. *Nat Rev Endocrinol*, 10(3), 130-132. doi:10.1038/nrendo.2013.248
- Orloff, K., Mistry, K., & Metcalf, S. (2009). Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 12(7), 509-524. doi:10.1080/10937400903358934
- Overstrom, E. W., Benos, D. J., & Biggers, J. D. (1989). Synthesis of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase by the preimplantation rabbit blastocyst. *J Reprod Fertil*, 85(1), 283-295. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536812>
- Ovesen, J. L., Fan, Y., Chen, J., Medvedovic, M., Xia, Y., & Puga, A. (2014). Long-term exposure to low-concentrations of Cr(VI) induce DNA damage and disrupt the transcriptional response to benzo[a]pyrene. *Toxicology*, 316, 14-24. doi:10.1016/j.tox.2013.12.001
- Ozkan, S., Murk, W., & Arici, A. (2008). Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci*, 1127, 92-100. doi:10.1196/annals.1434.007

- Paksy, K., Rajczy, K., Forgacs, Z., Lazar, P., Bernard, A., Gati, I., & Kaali, G. S. (1997). Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J Appl Toxicol*, 17(5), 321-327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9339745>
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810), 17-18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351601>
- Palis, J. (2008). Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 15(3), 155-161. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97ae1
- Panay, N., & Kalu, E. (2009). Management of premature ovarian failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 23(1), 129-140. doi:10.1016/j.bpobgyn.2008.10.008
- Pandian, Z., Bhattacharya, S., & Templeton, A. (2001). Review of unexplained infertility and obstetric outcome: a 10 year review. *Hum Reprod*, 16(12), 2593-2597. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726580>
- Pandian, Z., Bhattacharya, S., Vale, L., & Templeton, A. (2005). In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD003357. doi:10.1002/14651858.CD003357.pub2
- Pandit, G. G., Sahu, S. K., & Sadasivan, S. (2002). Distribution of HCH and DDT in the coastal marine environment of Mumbai, India. *J Environ Monit*, 4(3), 431-434. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094940>
- Park, B., McPartland, J. M., & Glass, M. (2004). Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(2), 189-197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14683692>
- Paszkowski, T., Clarke, R. N., & Hornstein, M. D. (2002). Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum Reprod*, 17(4), 921-925. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11925382>
- Patrizio, P., & Sakkas, D. (2009). From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 91(4), 1061-1066. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.003
- Pedersen, R. A., Meneses, J., Spindle, A., Wu, K., & Galloway, S. M. (1985). Cytochrome P-450 metabolic activity in embryonic and extraembryonic tissue lineages of mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(10), 3311-3315. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3858824>
- Penarrubia, J., Fabregues, F., Manau, D., Creus, M., Carmona, F., Casamitjana, R., . . . Balasch, J. (2005). Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod*, 20(3), 622-628. doi:10.1093/humrep/deh674
- Perry, E. P., & Smart, J. G. (1990). Hydrops tubae profluens--not a genitourinary fistula but a diagnosis to be missed. *Br J Urol*, 66(5), 547-548. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249130>
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, 145(1-2), 27-37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922096>
- Pichini, S., De Luca, R., Pellegrini, M., Marchei, E., Rotolo, M. C., Spoletini, R., . . . Scaravelli, G. (2012). Hair and urine testing to assess drugs of abuse consumption in couples undergoing assisted reproductive technology (ART). *Forensic Sci Int*, 218(1-3), 57-61. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.011
- Pierce, S. B., Gersak, K., Michaelson-Cohen, R., Walsh, T., Lee, M. K., Malach, D., . . . Levy-Lahad, E. (2013). Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am J Hum Genet*, 92(4), 614-620. doi:10.1016/j.ajhg.2013.03.007



- Pinborg, A., Hougaard, C. O., Nyboe Andersen, A., Molbo, D., & Schmidt, L. (2009). Prospective longitudinal cohort study on cumulative 5-year delivery and adoption rates among 1338 couples initiating infertility treatment. *Hum Reprod*, 24(4), 991-999. doi:10.1093/humrep/den463
- Plachot, M. (1997). The human oocyte. Genetic aspects. *Ann Genet*, 40(2), 115-120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259959>
- Pluchino, N., Drakopoulos, P., Wenger, J. M., Petignat, P., Streuli, I., & Genazzani, A. R. (2014). Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). *Hormones (Athens)*, 13(3), 314-322. doi:10.14310/horm.2002.1505
- Polak, G., Koziol-Montewka, M., Gogacz, M., Blaszkowska, I., & Kotarski, J. (2001). Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 94(2), 261-263. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165736>
- Popovic-Todorovic, B., Loft, A., Lindhard, A., Bangsboll, S., Andersson, A. M., & Andersen, A. N. (2003). A prospective study of predictive factors of ovarian response in 'standard' IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram. *Hum Reprod*, 18(4), 781-787. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660271>
- Poppe, W. A., Peeters, R., Daenens, P., Ide, P. S., & Van Assche, F. A. (1995). Tobacco smoking and the uterine cervix: cotinine in blood, urine and cervical fluid. *Gynecol Obstet Invest*, 39(2), 110-114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7737579>
- Poustie, V. J., Dodd, S., & Drakeley, A. J. (2007). Low-dose aspirin for in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev*(4), CD004832. doi:10.1002/14651858.CD004832.pub2
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive, E., & Infertility. (2008). Optimizing natural fertility. *Fertil Steril*, 90(5 Suppl), S1-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.122
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive, E., & Infertility. (2013). Optimizing natural fertility: a committee opinion. *Fertil Steril*, 100(3), 631-637. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.011
- Prakobphol, A., Genbacev, O., Gormley, M., Kapidzic, M., & Fisher, S. J. (2006). A role for the L-selectin adhesion system in mediating cytotrophoblast emigration from the placenta. *Dev Biol*, 298(1), 107-117. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.020
- Prueitt, R. L., Chen, H., Barnes, R. I., & Zinn, A. R. (2002). Most X;autosome translocations associated with premature ovarian failure do not interrupt X-linked genes. *Cytogenet Genome Res*, 97(1-2), 32-38. doi:64052
- Prunskaitė-Hyryläinen, R., Shan, J., Railo, A., Heinonen, K. M., Miinalainen, I., Yan, W., . . . Vainio, S. J. (2014). Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle. *FASEB J*, 28(4), 1568-1581. doi:10.1096/fj.13-233247
- Qin, Y., Jiao, X., Simpson, J. L., & Chen, Z. J. (2015). Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*, 21(6), 787-808. doi:10.1093/humupd/dmv036
- Qu, W., Bi, X., Sheng, G., Lu, S., Fu, J., Yuan, J., & Li, L. (2007). Exposure to polybrominated diphenyl ethers among workers at an electronic waste dismantling region in Guangdong, China. *Environ Int*, 33(8), 1029-1034. doi:10.1016/j.envint.2007.05.009
- Qublan, H., Amarín, Z., Nawasreh, M., Diab, F., Malkawi, S., Al-Ahmad, N., & Balawneh, M. (2006). Luteinized unruptured follicle syndrome: incidence and recurrence rate in infertile women with unexplained infertility undergoing intrauterine insemination. *Hum Reprod*, 21(8), 2110-2113. doi:10.1093/humrep/del113

- Quennell, J. H., Mulligan, A. C., Tups, A., Liu, X., Phipps, S. J., Kemp, C. J., . . . Anderson, G. M. (2009). Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology*, 150(6), 2805-2812. doi:10.1210/en.2008-1693
- Quintela, M., Barreiro, R., & Ruiz, J. M. (2002). Dumpton syndrome reduces the tributyltin (TBT) sterilising effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of the imposed vas deferens. *Mar Environ Res*, 54(3-5), 657-660. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408631>
- Ragni, G., De Lauretis, L., Gambaro, V., Di Pietro, R., Bestetti, O., Recalcatti, F., & Papetti, C. (1985). Semen evaluation in heroin and methadone addicts. *Acta Eur Fertil*, 16(4), 245-249. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4072581>
- Rajkhowa, M., McConnell, A., & Thomas, G. E. (2006). Reasons for discontinuation of IVF treatment: a questionnaire study. *Hum Reprod*, 21(2), 358-363. doi:10.1093/humrep/dei355
- Ramasamy, R., Scovell, J. M., Kovac, J. R., Cook, P. J., Lamb, D. J., & Lipshultz, L. I. (2015). Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 103(4), 906-909 e901. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.029
- Randolph, J. F., Jr. (2000). Unexplained infertility. *Clin Obstet Gynecol*, 43(4), 897-901. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11100304>
- Ratnaik, R. N. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J*, 79(933), 391-396. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897217>
- Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, BOE-A-1995-13535 C.F.R. (1995).
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. (1997). *Fertil Steril*, 67(5), 817-821. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130884>
- Richardson, G. A., Day, N. L., & McGauhey, P. J. (1993). The impact of prenatal marijuana and cocaine use on the infant and child. *Clin Obstet Gynecol*, 36(2), 302-318. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8513626>
- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Hum Reprod*, 27 Suppl 1, i2-21. doi:10.1093/humrep/des200
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., . . . Greco, E. (2005). Developmental potential of fully intact and partially damaged cryopreserved embryos after laser-assisted removal of necrotic blastomeres and post-thaw culture selection. *Fertil Steril*, 84(4), 888-894. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.04.038
- Riveles, K., Iv, M., Arey, J., & Talbot, P. (2003). Pyridines in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning in picomolar doses. *Reprod Toxicol*, 17(2), 191-202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642152>
- Riveles, K., Roza, R., Arey, J., & Talbot, P. (2004). Pyrazine derivatives in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 23. doi:10.1186/1477-7827-2-23
- Riveles, K., Roza, R., & Talbot, P. (2005). Phenols, quinolines, indoles, benzene, and 2-cyclopenten-1-ones are oviductal toxicants in cigarette smoke. *Toxicol Sci*, 86(1), 141-151. doi:10.1093/toxsci/kfi112
- Riveles, K., Tran, V., Roza, R., Kwan, D., & Talbot, P. (2007). Smoke from traditional commercial, harm reduction and research brand cigarettes impairs oviductal functioning in hamsters (*Mesocricetus auratus*) in vitro. *Hum Reprod*, 22(2), 346-355. doi:10.1093/humrep/del380
- Robinson, B. H. (2009). E-waste: an assessment of global production and environmental impacts. *Sci Total Environ*, 408(2), 183-191. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.09.044

- Rocha Monteiro, P. R., Reis-Henriques, M. A., & Coimbra, J. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat Toxicol*, 48(4), 549-559. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794836>
- Rogers, P. A., D'Hooghe, T. M., Fazleabas, A., Gargett, C. E., Giudice, L. C., Montgomery, G. W., . . . Zondervan, K. T. (2009). Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod Sci*, 16(4), 335-346. doi:10.1177/1933719108330568
- Rossato, M., Pagano, C., & Vettor, R. (2008). The cannabinoid system and male reproductive functions. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1, 90-93. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01680.x
- Rotterdam, E. A.-S. P. C. W. G. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 81(1), 19-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711538>
- Rubio-Gozalbo, M. E., Gubbels, C. S., Bakker, J. A., Menheere, P. P., Wodzig, W. K., & Land, J. A. (2010). Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Hum Reprod Update*, 16(2), 177-188. doi:10.1093/humupd/dmp038
- Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J., & Goldman, M. B. (2008). Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*, 14(4), 345-357. doi:10.1093/humupd/dmn011
- Ryan, J. J., Gasiewicz, T. A., & Brown, J. F., Jr. (1990). Human body burden of polychlorinated dibenzofurans associated with toxicity based on the yusho and yucheng incidents. *Fundam Appl Toxicol*, 15(4), 722-731. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128284>
- Saadat, P., Slater, C. C., Jain, J. K., Tourgeman, D. E., Stanczyk, F. Z., & Paulson, R. J. (2003). Treatment-associated serum FSH levels in very poor responders to ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet*, 20(10), 395-399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14649378>
- Safe, S. (2005). Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends Endocrinol Metab*, 16(4), 139-144. doi:10.1016/j.tem.2005.03.004
- Salha, O., Dada, T., & Sharma, V. (2001). Influence of body mass index and self-administration of hCG on the outcome of IVF cycles: a prospective cohort study. *Hum Fertil (Camb)*, 4(1), 37-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591255>
- Salonia, A., Matloob, R., Sacca, A., Ferrari, M., Gallina, A., Castiglione, F., . . . Montorsi, F. (2012). Are Caucasian-European men delaying fatherhood? Results of a 7 year observational study of infertile couples with male factor infertility. *Int J Androl*, 35(2), 125-132. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01197.x
- Sanders, S. R., Cuneo, S. P., & Turzillo, A. M. (2002). Effects of nicotine and cotinine on bovine theca interna and granulosa cells. *Reprod Toxicol*, 16(6), 795-800. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401508>
- Sarkar, M., Chaudhuri, G. R., Chattopadhyay, A., & Biswas, N. M. (2003). Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl*, 5(1), 27-31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646999>
- Sasamoto, T., Horii, S., Ibe, A., Takada, N., & Shiota, K. (2006). Concentration changes of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in human breast milk samples as shown by a follow-up survey. *Chemosphere*, 64(4), 642-649. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.10.054
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J. J., & Constable, J. D. (2006). Dioxins: an overview. *Environ Res*, 101(3), 419-428. doi:10.1016/j.envres.2005.12.003

- Scheringer, M., Jones, K. C., Matthies, M., Simonich, S., & van de Meent, D. (2009). Multimedia partitioning, overall persistence, and long-range transport potential in the context of POPs and PBT chemical assessments. *Integr Environ Assess Manag*, 5(4), 557-576. doi:10.1897/IEAM\_2009-007.1
- Schuurs, A. H. (1999). Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *J Dent*, 27(4), 249-256. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10193101>
- Shamaly, H., Mahameed, A., Sharony, A., & Shamir, R. (2004). Infertility and celiac disease: do we need more than one serological marker? *Acta Obstet Gynecol Scand*, 83(12), 1184-1188. doi:10.1111/j.0001-6349.2004.00592.x
- Shao, R., Weijdegard, B., Fernandez-Rodriguez, J., Egecioglu, E., Zhu, C., Andersson, N., . . . Billig, H. (2007). Ciliated epithelial-specific and regional-specific expression and regulation of the estrogen receptor-beta2 in the fallopian tubes of immature rats: a possible mechanism for estrogen-mediated transport process in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(1), E147-158. doi:10.1152/ajpendo.00101.2007
- Sharara, F. I., Beatse, S. N., Leonardi, M. R., Navot, D., & Scott, R. T., Jr. (1994). Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril*, 62(2), 257-262. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8034069>
- Sharovskaya, J., Kobliakova, I., Solomatina, N., & Kobliakov, V. (2006). Effect of some carcinogenic and non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junction intercellular communication in hepatoma cell cultures. *Eur J Cell Biol*, 85(5), 387-397. doi:10.1016/j.ejcb.2005.11.006
- Shiloh, H., Lahav-Baratz, S., Koifman, M., Ishai, D., Bidder, D., Weiner-Meganzi, Z., & Dirnfeld, M. (2004). The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum Reprod*, 19(1), 157-159. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688175>
- Silbergeld, E. K., Miller, L. P., Kennedy, S., & Eng, N. (1979). Lead, GABA, and seizures: effects of subencephalopathic lead exposure on seizure sensitivity and GABAergic function. *Environ Res*, 19(2), 371-382. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/227673>
- Simpson, J. L., & Rajkovic, A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet*, 89(4), 186-200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727994>
- Sinko, I., Morocz, M., Zadori, J., Kokavszky, K., & Rasko, I. (2005). Effect of cigarette smoking on DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay. *Reprod Toxicol*, 20(1), 65-71. doi:10.1016/j.reprotox.2004.12.007
- Sladkevicius, P., Valentin, L., & Marsal, K. (1993). Blood flow velocity in the uterine and ovarian arteries during the normal menstrual cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 3(3), 199-208. doi:10.1046/j.1469-0705.1993.03030199.x
- Smida, A. D., Valderrama, X. P., Agostini, M. C., Furlan, M. A., & Chedrese, J. (2004). Cadmium stimulates transcription of the cytochrome p450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cells. *Biol Reprod*, 70(1), 25-31. doi:10.1095/biolreprod.103.019000
- Soares, S. R., Simon, C., Remohi, J., & Pellicer, A. (2007). Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Hum Reprod*, 22(2), 543-547. doi:10.1093/humrep/del394
- Society of Hair, T. (2004). Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int*, 145(2-3), 83-84. doi:10.1016/j.forsciint.2004.04.022
- Soghomonians, A., Thirkill, T. L., Mariano, N. F., Barakat, A. I., & Douglas, G. C. (2004). Effect of aqueous tobacco smoke extract and shear stress on PECAM-1 expression and cell motility in human uterine endothelial cells. *Toxicol Sci*, 81(2), 408-418. doi:10.1093/toxsci/kfh210

- Srivastava, V., Dearth, R. K., Hiney, J. K., Ramirez, L. M., Bratton, G. R., & Dees, W. L. (2004). The effects of low-level Pb on steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the prepubertal rat ovary. *Toxicol Sci*, 77(1), 35-40. doi:10.1093/toxsci/kfg249
- Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., & Shalev, E. (2004). Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 59. doi:10.1186/1477-7827-2-59
- Stoica, A., Katzenellenbogen, B. S., & Martin, M. B. (2000). Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol*, 14(4), 545-553. doi:10.1210/mend.14.4.0441
- Sumpter, J. P., & Jobling, S. (1993). Male sexual development in "a sea of oestrogen". *Lancet*, 342(8863), 124-125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8100899>
- Sun, R. Z., Lei, L., Cheng, L., Jin, Z. F., Zu, S. J., Shan, Z. Y., . . . Liu, Z. H. (2010). Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *J Mol Histol*, 41(6), 325-332. doi:10.1007/s10735-010-9294-2
- Swan, G. E., & Lessov-Schlaggar, C. N. (2009). Tobacco addiction and pharmacogenetics of nicotine metabolism. *J Neurogenet*, 23(3), 262-271. doi:10.1080/01677060802572903
- Szamatowicz, M., & Grochowski, D. (1998). Fertility and infertility in aging women. *Gynecol Endocrinol*, 12(6), 407-413. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065166>
- Tabs, D., & Radunovic, N. (2002). [Significance of maternal and paternal age in assisted reproduction programs]. *Med Pregl*, 55(11-12), 535-538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712901>
- Takai, Y., Canning, J., Perez, G. I., Pru, J. K., Schlezinger, J. J., Sherr, D. H., . . . Tilly, J. L. (2003). Bax, caspase-2, and caspase-3 are required for ovarian follicle loss caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo. *Endocrinology*, 144(1), 69-74. doi:10.1210/en.2002-220814
- Talbot, P., DiCarlantonio, G., Knoll, M., & Gomez, C. (1998). Identification of cigarette smoke components that alter functioning of hamster (*Mesocricetus auratus*) oviducts in vitro. *Biol Reprod*, 58(4), 1047-1053. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546738>
- Tam, P. P., & Liu, W. K. (1985). Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages. *Teratology*, 32(3), 453-462. doi:10.1002/tera.1420320314
- Tan, S. L., Zaidi, J., Campbell, S., Doyle, P., & Collins, W. (1996). Blood flow changes in the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, 175(3 Pt 1), 625-631. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828425>
- Tan, T. Y., Lau, S. K., Loh, S. F., & Tan, H. H. (2014). Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. *Singapore Med J*, 55(6), 305-309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017405>
- Tanabe, S., & Kunisue, T. (2007). Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Environ Pollut*, 146(2), 400-413. doi:10.1016/j.envpol.2006.07.003
- Tang, A. W., Alfirevic, Z., & Quenby, S. (2011). Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum Reprod*, 26(8), 1971-1980. doi:10.1093/humrep/der164
- Tao, S., Liu, W. X., Li, X. Q., Zhou, D. X., Li, X., Yang, Y. F., . . . Coveney, R. M. (2009). Organochlorine pesticide residuals in chickens and eggs at a poultry farm in Beijing, China. *Environ Pollut*, 157(2), 497-502. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.005
- Tarlatzis, B. C., & Kolibianakis, E. M. (2007). GnRH agonists vs antagonists. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 21(1), 57-65. doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.08.002



- Tartaglia, N. R., Howell, S., Sutherland, A., Wilson, R., & Wilson, L. (2010). A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis*, 5, 8. doi:10.1186/1750-1172-5-8
- Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N., & Sutton, D. (2003). Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol*, 18(3), 149-175. doi:10.1002/tox.10116
- Tejera, A., Herrero, J., de Los Santos, M. J., Garrido, N., Ramsing, N., & Meseguer, M. (2011). Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril*, 96(3), 618-623 e612. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.06.059
- Tellez-Rojo, M. M., Bellinger, D. C., Arroyo-Quiroz, C., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-Garcia, A., Schnaas-Arrieta, L., . . . Hu, H. (2006). Longitudinal associations between blood lead concentrations lower than 10 microg/dL and neurobehavioral development in environmentally exposed children in Mexico City. *Pediatrics*, 118(2), e323-330. doi:10.1542/peds.2005-3123
- Terzic, M., & Kocijancic, D. (2010). [Pelvic inflammatory disease: contemporary diagnostic and therapeutic approach]. *Srp Arh Celok Lek*, 138(9-10), 658-663. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21180100>
- Thirkill, T. L., Vedagiri, H., & Douglas, G. C. (2006). Macaque trophoblast migration toward RANTES is inhibited by cigarette smoke-conditioned medium. *Toxicol Sci*, 91(2), 557-567. doi:10.1093/toxsci/kfj147
- Thyer, A. C., King, T. S., Moreno, A. C., Eddy, C. A., Siler-Khodr, T. M., & Schenken, R. S. (2001). Cocaine impairs ovarian response to exogenous gonadotropins in nonhuman primates. *J Soc Gynecol Investig*, 8(6), 358-362. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750872>
- Tielemans, E., van Kooij, R., Looman, C., Burdorf, A., te Velde, E., & Heederik, D. (2000). Paternal occupational exposures and embryo implantation rates after IVF. *Fertil Steril*, 74(4), 690-695. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020508>
- Torre, A., Pouly, J. L., & Wainer, B. (2010). [Anatomic evaluation of the female of the infertile couple]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 39(8 Suppl 2), S34-44. doi:10.1016/S0368-2315(10)70029-6
- Trapp, S., Bomholtz, L. M., & Legind, C. N. (2008). Coupled mother-child model for bioaccumulation of POPs in nursing infants. *Environ Pollut*, 156(1), 90-98. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.036
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update*, 14(3), 243-258. doi:10.1093/humupd/dmn004
- Tscheudschilsuren, G., Hombach-Klonisch, S., Kuchenhoff, A., Fischer, B., & Klonisch, T. (1999). Expression of the arylhydrocarbon receptor and the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator during early gestation in the rabbit uterus. *Toxicol Appl Pharmacol*, 160(3), 231-237. doi:10.1006/taap.1999.8773
- Tseng, C. H. (2007). Metabolism of inorganic arsenic and non-cancerous health hazards associated with chronic exposure in humans. *J Environ Biol*, 28(2 Suppl), 349-357. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17929750>
- Tsutsumi, R., Hiroi, H., Momoeda, M., Hosokawa, Y., Nakazawa, F., Yano, T., . . . Taketani, Y. (2009). Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil Steril*, 91(4 Suppl), 1614-1617. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.055
- Tural, S., Tekcan, A., Kara, N., Elbistan, M., Guven, D., & Ali Tasdemir, H. (2015). FMR1 gene mutation screening by TP-PCR in patients with premature ovarian failure and fragile-X. *Gynecol Endocrinol*, 31(3), 191-195. doi:10.3109/09513590.2014.975685

- Tuttle, A. M., Stampfli, M., & Foster, W. G. (2009). Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Hum Reprod*, 24(6), 1452-1459. doi:10.1093/humrep/dep023
- van Dam, R. M. (2008). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(6), 1269-1283. doi:10.1139/H08-120
- van den Akker, E. L., van Alfen, A. A., Sas, T., Kerstens, M., Cools, M., & Lambalk, C. B. (2014). [Clinical guideline 'Turner syndrome']. *Ned Tijdschr Geneesk*, 158, A7375. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666534>
- van den Berg, H. (2009). Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect*, 117(11), 1656-1663. doi:10.1289/ehp.0900785
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., . . . Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci*, 93(2), 223-241. doi:10.1093/toxsci/kfl055
- Van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H., & Olson, J. R. (1994). The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 24(1), 1-74. doi:10.3109/10408449409017919
- van der Steeg, J. W., Steures, P., Eijkemans, M. J., Habbema, J. D., Hompes, P. G., Burggraaff, J. M., . . . Mol, B. W. (2008). Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod*, 23(2), 324-328. doi:10.1093/humrep/dem371
- van der Vaart, H., Postma, D. S., Timens, W., & ten Hacken, N. H. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 59(8), 713-721. doi:10.1136/thx.2003.012468
- van Loendersloot, L. L., van Wely, M., Limpens, J., Bossuyt, P. M., Repping, S., & van der Veen, F. (2010). Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 16(6), 577-589. doi:10.1093/humupd/dmq015
- van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., te Velde, E. R., Fauser, B. C., Bancsi, L. F., de Jong, F. H., & Themmen, A. P. (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*, 17(12), 3065-3071. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456604>
- Van Voorhis, B. J., Dawson, J. D., Stovall, D. W., Sparks, A. E., & Syrop, C. H. (1996). The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. *Obstet Gynecol*, 88(5), 785-791. doi:10.1016/0029-7844(96)00286-4
- Vandeghechuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 764-765, 36-45. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.08.008
- Veleva, Z., Tiitinen, A., Vilksa, S., Hyden-Granskog, C., Tomas, C., Martikainen, H., & Tapanainen, J. S. (2008). High and low BMI increase the risk of miscarriage after IVF/ICSI and FET. *Hum Reprod*, 23(4), 878-884. doi:10.1093/humrep/den017
- Venetis, C. A., Papadopoulos, S. P., Campo, R., Gordts, S., Tarlatzis, B. C., & Grimbizis, G. F. (2014). Clinical implications of congenital uterine anomalies: a meta-analysis of comparative studies. *Reprod Biomed Online*, 29(6), 665-683. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.006
- Verhaak, C. M., Smeenk, J. M., Evers, A. W., van Minnen, A., Kremer, J. A., & Kraaijmaat, F. W. (2005). Predicting emotional response to unsuccessful fertility treatment: a prospective study. *J Behav Med*, 28(2), 181-190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957573>

- Vidal, J. D., VandeVoort, C. A., Marcus, C. B., Lazarewicz, N. R., & Conley, A. J. (2006). In vitro exposure to environmental tobacco smoke induces CYP1B1 expression in human luteinized granulosa cells. *Reprod Toxicol*, 22(4), 731-737. doi:10.1016/j.reprotox.2006.06.001
- Vini, L., Hyer, S., Al-Saadi, A., Pratt, B., & Harmer, C. (2002). Prognosis for fertility and ovarian function after treatment with radioiodine for thyroid cancer. *Postgrad Med J*, 78(916), 92-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807191>
- vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., . . . Zoeller, R. T. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 24(2), 131-138. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.005
- Vrsanska, S., Nagyova, E., Mlynarcikova, A., Fickova, M., & Kolena, J. (2003). Components of cigarette smoke inhibit expansion of oocyte-cumulus complexes from porcine follicles. *Physiol Res*, 52(3), 383-387. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790772>
- Wang, C., Chan, V., & Yeung, R. T. (1978). The effect of heroin addiction on pituitary-testicular function. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 9(5), 455-461. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/569031>
- Wang, J. X., Davies, M., & Norman, R. J. (2000). Body mass and probability of pregnancy during assisted reproduction treatment: retrospective study. *BMJ*, 321(7272), 1320-1321. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090515>
- Warenik-Szymankiewicz, A., & Slopian, R. (2005). [Genetic aspects of premature ovarian failure]. *Endokrynol Pol*, 56(3), 359-361. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16350732>
- Watson, W. H., & Yager, J. D. (2007). Arsenic: extension of its endocrine disruption potential to interference with estrogen receptor-mediated signaling. *Toxicol Sci*, 98(1), 1-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17650541>
- Waylen, A. L., Metwally, M., Jones, G. L., Wilkinson, A. J., & Ledger, W. L. (2009). Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 15(1), 31-44. doi:10.1093/humupd/dmn046
- Weetman, A. P. (1995). Autoimmunity to steroid-producing cells and familial polyendocrine autoimmunity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 9(1), 157-174. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7726795>
- Weigert, M., Feichtinger, W., Kulin, S., Kaali, S. G., Dorau, P., & Bauer, P. (2001). Seasonal influences on in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*, 18(11), 598-602. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804428>
- Wemeau, J. L., Proust-Lemoine, E., Ryndak, A., & Vanhove, L. (2013). Thyroid autoimmunity and polyglandular endocrine syndromes. *Hormones (Athens)*, 12(1), 39-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624130>
- Wiebe, J. P., & Barr, K. J. (1988). Effect of prenatal and neonatal exposure to lead on the affinity and number of estradiol receptors in the uterus. *J Toxicol Environ Health*, 24(4), 451-460. doi:10.1080/15287398809531176
- Wiebe, J. P., Barr, K. J., & Buckingham, K. D. (1988). Effect of prenatal and neonatal exposure to lead on gonadotropin receptors and steroidogenesis in rat ovaries. *J Toxicol Environ Health*, 24(4), 461-476. doi:10.1080/15287398809531177
- Wigle, D. T., Arbuckle, T. E., Turner, M. C., Berube, A., Yang, Q., Liu, S., & Krewski, D. (2008). Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 11(5-6), 373-517. doi:10.1080/10937400801921320



- Williams, E. S., Panko, J., & Paustenbach, D. J. (2009). The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements. *Crit Rev Toxicol*, 39(7), 553-575. doi:10.1080/10408440903036056
- Windham, G. C., Fenster, L., & Swan, S. H. (1992). Moderate maternal and paternal alcohol consumption and the risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*, 3(4), 364-370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1637900>
- Winter, E., Wang, J., Davies, M. J., & Norman, R. (2002). Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod*, 17(12), 3220-3223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456627>
- Wise, L. A., Rothman, K. J., Mikkelsen, E. M., Sorensen, H. T., Riis, A. H., & Hatch, E. E. (2012). A prospective cohort study of physical activity and time to pregnancy. *Fertil Steril*, 97(5), 1136-1142 e1131-1134. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.025
- Witchel, S. F., & Tena-Sempere, M. (2013). The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: lessons from physiology and putative pathophysiologic implications. *Fertil Steril*, 100(1), 12-22. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.05.024
- Wittemer, C., Menard, A., & Dellenbach, P. (1990). Peritoneal fluid and infertility: a comparison of in-vitro fertilization of oocytes in peritoneal fluid and B2-Menezo medium. *Hum Reprod*, 5(8), 955-958. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081807>
- Wong, P. S., & Matsumura, F. (2007). Promotion of breast cancer by beta-hexachlorocyclohexane in MCF10AT1 cells and MMTV-neu mice. *BMC Cancer*, 7, 130. doi:10.1186/1471-2407-7-130
- Wyatt, T. A., Schmidt, S. C., Rennard, S. I., Tuma, D. J., & Sisson, J. H. (2000). Acetaldehyde-stimulated PKC activity in airway epithelial cells treated with smoke extract from normal and smokeless cigarettes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 225(1), 91-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998203>
- Xiao, W., Liu, Y., & Templeton, D. M. (2009). Pleiotropic effects of cadmium in mesangial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 315-326. doi:10.1016/j.taap.2009.02.005
- Yaktine, A. L., Harrison, G. G., & Lawrence, R. S. (2006). Reducing exposure to dioxins and related compounds through foods in the next generation. *Nutr Rev*, 64(9), 403-409. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17002236>
- Yu, H. S., Tam, P. P., & Chan, S. T. (1985). Effects of cadmium on preimplantation mouse embryos in vitro with special reference to their implantation capacity and subsequent development. *Teratology*, 32(3), 347-353. doi:10.1002/tera.1420320304
- Zdravkovic, T., Genbacev, O., Prakobphol, A., Cvetkovic, M., Schanz, A., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2006). Nicotine downregulates the I-selectin system that mediates cytotrophoblast emigration from cell columns and attachment to the uterine wall. *Reprod Toxicol*, 22(1), 69-76. doi:10.1016/j.reprotox.2006.01.005
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., . . . World Health, O. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod*, 24(11), 2683-2687. doi:10.1093/humrep/dep343
- Zenzes, M. T. (2000). Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update*, 6(2), 122-131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782570>
- Zenzes, M. T., Krishnan, S., Krishnan, B., Zhang, H., & Casper, R. F. (1995). Cadmium accumulation in follicular fluid of women in in vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil Steril*, 64(3), 599-603. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641916>

- Zenzes, M. T., Puy, L. A., & Bielecki, R. (1997). Immunodetection of cotinine protein in granulosa-lutein cells of women exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril*, 68(1), 76-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207588>
- Zenzes, M. T., Puy, L. A., & Bielecki, R. (1998). Immunodetection of benzo[a]pyrene adducts in ovarian cells of women exposed to cigarette smoke. *Mol Hum Reprod*, 4(2), 159-165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542974>
- Zenzes, M. T., Puy, L. A., Bielecki, R., & Reed, T. E. (1999). Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 5(2), 125-131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065867>
- Zenzes, M. T., Reed, T. E., & Casper, R. F. (1997). Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod*, 12(8), 1736-1741. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9308804>
- Zenzes, M. T., Reed, T. E., Wang, P., & Klein, J. (1996). Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in in vitro fertilization therapy. *Fertil Steril*, 66(4), 614-619. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816626>
- Zenzes, M. T., Wang, P., & Casper, R. F. (1995). Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod*, 10(12), 3213-3217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822447>
- Zeyneloglu, H. B., Arici, A., Olive, D. L., & Duleba, A. J. (1998). Comparison of intrauterine insemination with timed intercourse in superovulated cycles with gonadotropins: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 69(3), 486-491. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531883>
- Zhang, L., Connor, E. E., Chegini, N., & Shiverick, K. T. (1995). Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines. *Biochem Pharmacol*, 50(8), 1171-1180. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7488231>
- Zhang, W., Yang, J., Wang, J., Xia, P., Xu, Y., Jia, H., & Chen, Y. (2007). Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of cadmium and p-nonylphenol. *Toxicology*, 241(1-2), 84-91. doi:10.1016/j.tox.2007.08.089
- Zhao, X. J., Huang, Y. H., Yu, Y. C., & Xin, X. Y. (2010). GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats. *Gynecol Oncol*, 118(1), 69-75. doi:10.1016/j.ygyno.2010.03.021
- Zollner, U., Zollner, K. P., Blissing, S., Pohls, U., Steck, T., Dietl, J., & Muller, T. (2003). Impact of three-dimensionally measured endometrial volume on the pregnancy rate after intrauterine insemination. *Zentralbl Gynakol*, 125(3-4), 136-141. doi:10.1055/s-2003-41863
- Zumbado, M., Goethals, M., Alvarez-Leon, E. E., Luzardo, O. P., Cabrera, F., Serra-Majem, L., & Dominguez-Boada, L. (2005). Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ*, 339(1-3), 49-62. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.07.022